

**Validación de la línea celular leucémica HL-60 como modelo
para el estudio de muerte celular y arginasa en neutrófilos
humanos**

Carlota Ramos Corral

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: Dr. Juan B. Fernández Larrea, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universitat Rovira i Virgili, juanbautista.fernandez@urv.cat

En cooperación con: Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas / CSIC

Supervisor/es: Faustino Mollinedo García, Laboratorio de Muerte Celular y terapia del Cáncer, (Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid), fmollin@cib.csic.es

Tarragona, junio 2021

Yo, Carlota Ramos Corral, con DNI 47860194-T, soy concedora de la guía de prevención de plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<https://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2021



RESUMEN

Los neutrófilos humanos son la primera línea de defensa del organismo frente a la infección y son células clave en el proceso inflamatorio. El interés en este tipo celular ha crecido exponencialmente en los últimos años debido a su relación con un mal pronóstico de ciertas enfermedades, entre ellas el cáncer. Los neutrófilos maduros son células terminales de vida media corta, que sufren apoptosis espontánea y que no se pueden cultivar *in vitro*. Además, la arginasa 1, presente en neutrófilos humanos, aunque su exacta localización subcelular sigue siendo controvertida, inhibe la acción de linfocitos T mediante depleción de arginina, y puede jugar un papel importante en procesos de inmunovigilancia en cáncer. Estas células también pueden morir mediante un proceso denominado NETosis, a través de mecanismos no bien definidos. En el presente estudio se ha caracterizado la diferenciación de la línea celular HL-60 hacia células de tipo neutrófilo mediante incubación con dimetilsulfóxido; se ha analizado la localización subcelular de la arginasa en neutrófilos humanos, determinando que está ausente en el citosol y presente, al menos, en los gránulos azurófilos; así como su presencia durante la diferenciación de células HL-60 hacia neutrófilos, como pasos iniciales para determinar la línea celular HL-60, como un modelo de cultivo celular para estudios de muerte celular y arginasa en neutrófilos humanos.

Palabras clave: neutrófilos, HL-60, arginasa 1, muerte celular, NETosis.

ABSTRACT

Human neutrophils are the body's first line of defense against infection, and they are key cells in the inflammatory process. Interest in this cell type has grown exponentially in recent years due to its relationship with poor prognosis in certain diseases, including cancer. Mature neutrophils are terminal cells with a short half-life, which undergo spontaneous apoptosis and they cannot be cultured *in vitro*. In addition, arginase 1, present in human neutrophils, although its exact subcellular localization remains controversial, inhibits the action of T lymphocytes through arginine depletion, and may play an important role in immunosurveillance processes in cancer. Human neutrophils can also die by a process called NETosis, through mechanisms that are not well defined. In the present study, the differentiation of the HL-60 cell line into neutrophil-like cells by dimethyl sulfoxide incubation has been characterized; the subcellular localization of arginase in human neutrophils has been analyzed, leading to the notion that it is absent in the cytosol and present, at least, in the azurophil granules; and arginase-1 has been found to be induced during the differentiation of HL-60 towards neutrophil-like cells. These

findings represent initial stages in determining HL-60 cells as a cell culture model to study neutrophil cell death and arginase-related processes.

Key words: neutrophils, HL-60, arginase 1, cell death, NETosis.

RESUM

Els neutròfils humans són la primera línia de defensa de l'organisme front la infecció i són cèl·lules clau en el procés inflamatori. L'interès en aquest tipus cel·lular ha crescut exponencialment en els darrers anys degut a la seva relació amb un mal pronòstic de certes malalties, entre elles el càncer. Els neutròfils madurs són cèl·lules terminals de vida mitja curta, que pateixen apoptosi espontània i que no es poden cultivar *in vitro*. A més, l'arginasa 1, present en neutròfils humans, encara que la seva localització exacta subcel·lular segueix sent controvertida, inhibeix l'acció de limfòcits T mitjançant depleció d'arginina, i pot jugar un paper important en processos d'immunovigilància en càncer. Aquestes cèl·lules també poden morir mitjançant un procés denominat NETosi, a través de mecanismes no ben definits. En el present estudi s'ha caracteritzat la diferenciació de la línia cel·lular HL-60 cap a cèl·lules de tipus neutròfil mitjançant incubació amb dimetilsulfòxid; s'ha analitzat la localització subcel·lular de l'arginasa en neutròfils humans, determinant que està absent al citosol i present, almenys, en els grànuls atzuròfils; així com la seva presència durant la diferenciació de cèl·lules HL-60 cap a neutròfils, com passos inicials per a determinar la línia cel·lular HL-60, com un model de cultiu cel·lular per a estudis de mort cel·lular i arginasa en neutròfils humans.

Paraules clau: neutròfils, HL-60, arginasa 1, mort cel·lular, NETosi.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Muerte Celular y Terapia del Cáncer (Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) bajo la supervisión del Dr. Faustino Mollinedo, y fue financiado por el proyecto SAF2017-89672-R (*Lipid rafts and inflammatory tumor environment in cancer therapy: alkylphospholipid analogs as raft- and inflammation-targeting agents with manifold therapeutic indications*) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España.

El Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) es uno de los centros de investigación con mayor prestigio y tradición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). En este centro desarrollaron sus investigaciones destacadas generaciones de científicos desde su fundación en 1953, y en él se siguen formando las nuevas. En 2019, en homenaje a una de las investigadoras más relevantes, el CIB pasó a denominarse Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas.

Actualmente el CIB Margarita Salas está organizado en cuatro departamentos. En ellos se articulan las investigaciones sobre la estructura y organización de la materia viva y sus procesos, así como las tendentes a comprender las bases de la enfermedad y descubrir tratamientos experimentales, y a desarrollar procesos biotecnológicos relacionados con el crecimiento sostenible y la producción agrícola. De esta forma, se conjuga la generación de nuevo conocimiento con el desarrollo de posibles aplicaciones para la solución de problemas actuales y futuros de la sociedad.

Este trabajo no hubiese sido posible sin la cooperación del Dr. Faustino Mollinedo, quien ha supervisado mi trabajo y ha confiado en mí desde el primer momento. Gracias por brindarme la oportunidad de poder realizar las prácticas y el trabajo de fin de grado en vuestro grupo de investigación.

Gracias también a Sandra Pardo, quien me ha ayudado y aconsejado durante mi paso por el laboratorio.

Gracias a Juan, quien ha supervisado y me ha aconsejado durante la realización de este trabajo.

Y sobre todo gracias a mi familia, por darme la educación necesaria, por haber hecho posible que esté donde estoy y por confiar siempre en mí.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
RESUM	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
NEUTRÓFILOS	10
Gránulos de neutrófilos	11
Funciones de los neutrófilos	11
Tipos de muerte en los neutrófilos.....	13
Línea celular HL-60	17
Diferenciación de células HL-60 hacia neutrófilos.....	17
Ureohidrolasa arginasa	18
Arginasa 1	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Materiales	23
Anticuerpos.....	23
Reactivos y otros productos	23
Equipos	23
Modelos celulares	24
Línea celular HL-60	24
Neutrófilos de sangre periférica humana.....	24
Enfoque experimental	25
Cultivo celular	26
Determinación del antígeno de superficie celular CD11b/CD18	26
Determinación de la viabilidad celular mediante incorporación de Yoduro de Propidio (IP)	26
Determinación del potencial de membrana mitocondrial (DiOC ₆).....	27
Determinación del ciclo celular	27
Cuantificación proteica	27
Western Blot.....	27
Aislamiento de neutrófilos	28
Fraccionamiento subcelular de neutrófilos	28
Inducción de la NETosis en HL-60.....	29
RESULTADOS	30
CONCLUSIONES	37
DISCUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	44
AUTOEVALUACIÓN	49
ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de Granulopoyesis	10
Figura 2: Funciones de los neutrófilos	12
Figura 3: Diagrama de cinta del trímero de Arginasa 1	19
Figura 4. Vías metabólicas en la cuales está implicada la arginasa 1	20
Figura 5. Morfología celular, forma nuclear y cultivo de células HL-60 indiferenciadas	24
Figura 6. Diagrama de flujo de todos los experimentos realizados.....	25
Figura 7. Expresión del antígeno de superficie celular CD11b/CD18 (Mo1) en células HL-60 durante la diferenciación en neutrófilos	31
Figura 8. Estudio de la viabilidad celular mediante el fluorocromo IP	32
Figura 9. Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda fluorescente DiOC₆	33
Figura 10. Análisis del proceso de muerte apoptótica a través del ciclo celular	34
Figura 11. Expresión de arginasa 1 en células HL-60 incubadas con DMSO 1,3% (v/v)	35
Figura 12. Expresión de arginasa 1 en las fracciones subcelulares de los neutrófilos	35
Figura 13. Estudio de la inducción de NETosis en HL-60 diferenciadas en neutrófilos	36

Figuras de los Anexos

Figura A1. Expresión del antígeno de superficie celular CD11b/CD18 (Mo1) en células HL-60 durante la diferenciación en neutrófilos (datos completos)	50
Figura A2. Estudio de la viabilidad celular mediante el fluorocromo IP (datos completos)....	50
Figura A3. Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda fluorescente DiOC₆ (datos completos).....	51
Figura A4. Análisis del proceso de muerte apoptótica a través del ciclo celular (datos completos)	51
Figura A5 . Diagrama de flujo des de la obtención de sangre periférica humana y el fraccionamiento subcelular de neutrófilos, hasta la localización de la arginasa mediante Western blot.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARG1	Arginasa 1
ARG2	Arginasa 2
ASL	Argininosuccinato liasa
ASS	Argininosuccinato sintasa
BSA	Albúmina de suero bovino
DIOC ₆	Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular
FCS	Suero de ternera fetal
GMP	Células progenitoras de granulocitos-monocitos
IP	Yoduro de propidio
MPO	Mieloperoxidasa
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NETOSIS	Proceso de muerte por el cual se expulsan las Neutrophil Extracellular Traps
NLR	<i>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
OAT	Ornitina aminotransferasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
PAD4	Peptidilarginina deiminasa 4
PBS	Tampón fosfato salino
PMA	4β-forbol 12-miristato-13-acetato
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TH1	Linfocitos T <i>helper</i> 1
TH2	Linfocitos T <i>helper</i> 2

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha demostrado que elevados niveles de NLR (Neutrophil-to-lymphocyte ratio) son un indicador de un mal pronóstico en algunos cánceres (Kang et al., 2019), y se han identificado varias afecciones inflamatorias como factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (Iwai et al., 2020). Sin embargo, la relación entre la inflamación y el cáncer no es nueva, ya en 1863, el médico y patólogo alemán Rudolf Ludwig Karl Virchow postuló que el cáncer se originaba en sitios de inflamación crónica, al descubrir la infiltración de leucocitos en los tejidos neoplásicos, estableciendo así el primer vínculo entre la inflamación y el cáncer (Khandia & Munjal, 2020). Por eso, la visión clásica de que los neutrófilos desempeñan un papel pasivo, simplemente respondiendo a señales externas o siendo considerados espectadores, ahora está siendo reemplazada por la noción de que los neutrófilos pueden influir en otras células, incluidas las cancerosas.

Los neutrófilos tienen la capacidad de interactuar físicamente con las células tumorales circulantes, lo que facilita su unión al endotelio. También pueden promover la progresión tumoral induciendo la proliferación de estas células y desactivando la inmunidad antitumoral dependiente de células T (Szczerba et al., 2019). Además, las proteínas que contienen los gránulos de los neutrófilos pueden ser liberadas mediante procesos tales como la NETosis y se han asociado con la progresión del tumor, ya que estas pueden permitir que los neutrófilos, y posiblemente las células cancerosas asociadas, abandonen el torrente sanguíneo y entren en tejidos inflamados (Munir et al., 2021). Una de estas proteínas relacionada con la generación de un nicho inmunosupresor es la arginasa 1 (ARG1). Los neutrófilos de sangre periférica humana expresan constitutivamente altas cantidades de ARG1 que, una vez liberada, induce una supresión profunda de la activación y proliferación de células T (Czystowska-Kuzmicz et al., 2019).

Al reunir el conocimiento actual sobre la biología de los neutrófilos y su participación en la progresión del cáncer, surge un nuevo marco conceptual mediado por estas células inmunitarias, debido a que muestran una capacidad extraordinaria para extravasarse de los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes. Las células cancerosas podrían aprovechar este sello distintivo de los neutrófilos para diseminarse por el cuerpo camuflándose del sistema inmunológico, gracias a la exocitosis del contenido de los gránulos de los neutrófilos, que dirigiría el transporte tanto de células tumorales como de las células inmunitarias hacia un nuevo órgano donde se podría producir la metástasis (Mollinedo, 2019). Por un lado, este proceso podría verse facilitado por la aparición de eventos inflamatorios previos en esa nueva ubicación,

lo que eventualmente atraería más neutrófilos, algunos de los cuales podrían transportar células cancerosas. Por otro lado, debido a que los neutrófilos maduros son células de vida corta, se puede esperar que mueran rápidamente en la ubicación del nuevo tejido y, por lo tanto, los neutrófilos moribundos podrían servir como alimento para las células cancerosas metastatizadas. Dado que la muerte de neutrófilos también puede facilitar la liberación de arginasa 1, presumiblemente podría crearse un sitio inmunológico privilegiado para el tumor evadiendo el sistema inmunológico (Mollinedo, 2019).

NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son células sanguíneas que pertenecen al grupo de los granulocitos. Éstos son miembros del sistema inmunológico innato y constituyen el subtipo de leucocitos más abundante que circula en la sangre (50-70%). Son la principal línea de defensa del organismo frente a patógenos y se desarrollan en la médula ósea a partir de células progenitoras de granulocitos-monocitos (GMP) mediante un proceso denominado granulopoyesis (Figura 1) (Blanter et al., 2021).

Una de las características distintivas de los neutrófilos es su núcleo segmentado que contiene de dos a cinco lóbulos conectados por finos filamentos de cromatina y un citoplasma lleno de gránulos. Según la biosíntesis de los gránulos durante la maduración de los neutrófilos en la médula ósea, éstos se pueden clasificar en las siguientes tres categorías: gránulos azurófilos (primarios), gránulos específicos (secundarios) y gránulos de gelatinasa (terciarios).

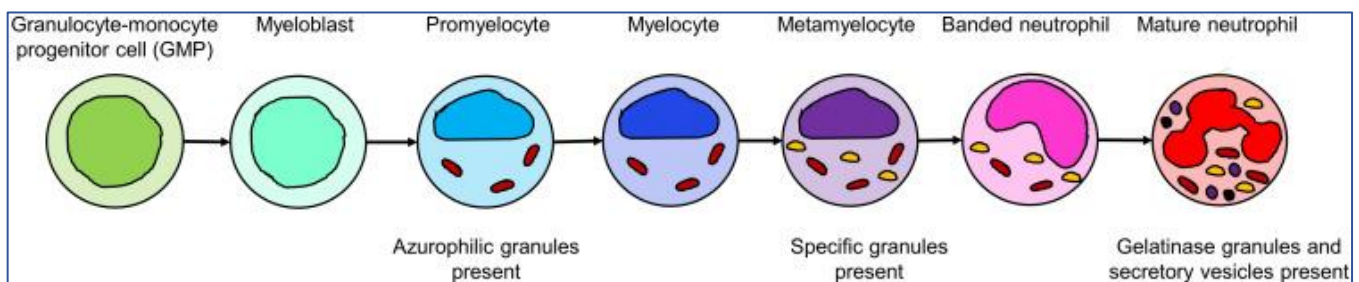


Figura 1: Proceso de Granulopoyesis. En el proceso de granulopoyesis los neutrófilos se desarrollan gradualmente a partir de células progenitoras de granulocitos y monocitos (GMP). Cada etapa tiene un fenotipo único que se compone de características morfológicas y marcadores de superficie celular. En el primer paso, la célula pasa a la etapa de mieloblasto, el estado más indiferenciado. La etapa de promielocitos se caracteriza por la aparición de gránulos azurófilos. Los gránulos específicos comienzan a desarrollarse en la etapa de mielocitos y están completamente presentes en la etapa de metamielocitos; este es también el punto en el que la célula pierde su capacidad proliferativa. Después de la etapa de metamielocito, la célula puede denominarse neutrófilo; adquiere el núcleo en bandas distintivo y desarrolla gránulos de gelatinasa y vesículas secretoras. *Imagen tomada de* (Blanter et al., 2021).

Una vez obtenida la célula terminal (neutrófilo maduro), este es capaz de abandonar la médula ósea y circular hacia el torrente sanguíneo hasta que es reclutado para desempeñar una labor de defensa antimicrobiana mediante fagocitosis del microorganismo y mediante la liberación de las sustancias de sus gránulos en los tejidos, donde permanece 1 o 2 días y, posteriormente, muere.

Gránulos de neutrófilos

Los neutrófilos maduros son células versátiles y su funcionalidad depende en gran medida de la composición de sus gránulos citoplasmáticos que se movilizan para fusionarse con la membrana plasmática (exocitosis), las vacuolas endocíticas (endocitosis) u otros gránulos.

Los neutrófilos contienen un orgánulo muy fácilmente fusionable con la membrana plasmática, denominado vesícula secretora y, como se ha mencionado anteriormente, están dotados de tres tipos principales de gránulos citoplasmáticos que modulan la función celular: gránulos primarios o azurófilos, gránulos secundarios o específicos y gránulos terciarios o de gelatinasa. Los gránulos azurófilos son los depósitos de mieloperoxidasa (MPO) y de la mayoría de las proteínas proteolíticas y bactericidas, y se considera que son el compartimento microbicida movilizado durante la fagocitosis. Por el contrario, los gránulos secundarios y terciarios contienen proteínas que interactúan y degradan la matriz extracelular (ECM) (Bedouhène et al., 2020). Los gránulos terciarios desempeñan un papel crucial en la modulación de la biología de los neutrófilos porque se movilizan fácilmente tras la estimulación y albergan componentes cruciales de tres respuestas funcionales tempranas de los neutrófilos durante la inflamación, como la producción de anión superóxido, la adhesión celular (CD11b/CD18), y la diapédesis o extravasación. (Mollinedo, 2019)

Funciones de los neutrófilos

Como se ha mencionado anteriormente, los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa del organismo frente a lesiones e infecciones bacterianas, micóticas y algunas virales. Además, participan como elementos amplificadores que, en asociación con el complemento, se encargan de eliminar a los agentes extraños y otros componentes de su microambiente. Se conocen diversas estrategias utilizadas por los neutrófilos para eliminar los microorganismos invasores (Blanter et al., 2021):

- La fagocitosis y, consigo, la eliminación del patógeno internalizado exponiéndolo a un estallido oxidativo y a compuestos antimicrobianos que son descargados de los gránulos citoplasmáticos en las vacuolas fagocíticas.

- La degranulación, que implica la liberación de sustancias antimicrobianas en el sitio de infección.
- La liberación de estructuras en red de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas microbicidas al espacio extracelular, conocidas como «trampas extracelulares de neutrófilos» (NET, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*). Estas trampas representan una estrategia de defensa para evitar la diseminación microbiana, concentrando la acción de los microbicidas. Se tratan de hebras de ADN mezcladas con histonas y proteínas granulares, que pueden inmovilizar y matar patógenos.
- La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar a los patógenos tanto intracelular como extracelularmente.
- Finalmente, los neutrófilos pueden producir diversas citocinas que atraen a otras células inmunitarias al sitio de inflamación.

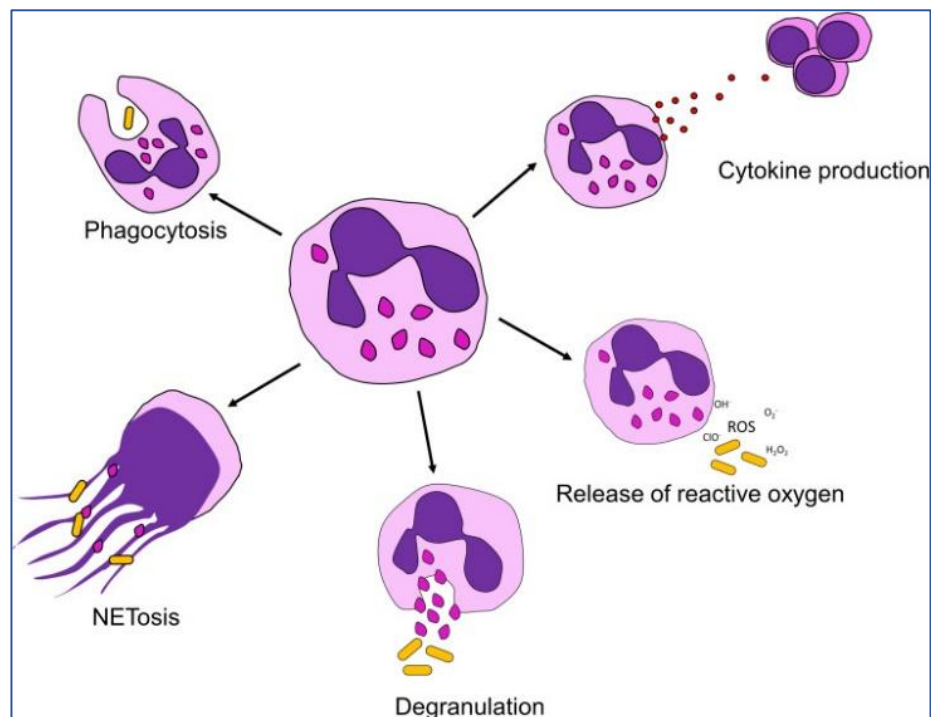


Figura 2: Funciones de los neutrófilos. Imagen tomada de (Blanter et al., 2021).

Algunas proteínas de membrana desempeñan un papel importante en las funciones del neutrófilo. Entre ellas, y de importancia fundamental, está una familia de glucoproteínas que promueve la adhesión (CD11b/CD18). Estas glucoproteínas están presentes en monocitos, macrófagos y neutrófilos y participan en las actividades donde interviene la adhesión, como la agregación y la citotoxicidad mediada por células. CD11b/CD18 es una proteína abundante en los neutrófilos y su importante función queda evidenciada al usar anticuerpos contra la

subunidad α , CD11b, ya que todas las actividades dependientes de adhesión quedan inhibidas, así como la agregación y la quimiotaxis.

Tras realizar sus funciones, el neutrófilo muere con relativa facilidad, de forma espontánea, para evitar reacciones inflamatorias desmesuradas mediante una muerte controlada y ordenada que lo dispone a ser fagocitado, a su vez, por los macrófagos.

Tipos de muerte en los neutrófilos

Apoptosis

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada más estudiado debido a que mantiene el balance fisiológico entre la proliferación y la eliminación celular. La detección de ligandos inductores de muerte, ácidos nucleicos, ROS, mediadores inflamatorios, toxinas y fármacos, entre otras sustancias, activa mecanismos que llevan a la célula a su propia destrucción. Estas moléculas pueden aumentar su concentración como consecuencia de un daño tisular que produzca la muerte de otras células, lo cual lleva a la liberación de su contenido al espacio extracelular. Cuando la célula entra en apoptosis induce la activación de caspasas, que son proteasas con un residuo de cisteína (C) que fragmentan proteínas inmediatamente después de los residuos de aspartato (Asp). Las caspasas provocan el colapso de los componentes subcelulares, el inicio de la condensación y fragmentación del ADN y la disminución del tamaño celular y nuclear.

En este tipo de muerte, la integridad de la membrana plasmática se mantiene intacta hasta que comienza la formación de cuerpos apoptóticos, cuya función es contener el material celular y evitar que éste actúe como desencadenante de la muerte de otras células. Una vez finalizada la apoptosis, otras células especializadas fagocitan los cuerpos apoptóticos.

Se han identificado diferentes vías que pueden conducir a la apoptosis: la primera se activa de manera extrínseca mediante la detección de ligandos endógenos como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o el ligando Fas (FasL) que se unen a receptores de muerte (*death receptors*) (Galluzzi et al., 2012). La activación de receptores de muerte induce la activación de la caspasa iniciadora 8 o 10.

La segunda vía se activa de manera intrínseca por estímulos no dependientes de un receptor, puede ser provocada por una plétora de condiciones de estrés intracelular que incluyen daño al ADN, estrés oxidativo, sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, acumulación de proteínas desplegadas en el retículo endoplasmático, etc. Aunque las cascadas de señalización que desencadenan la apoptosis intrínseca son muy heterogéneas en lo que respecta a los estímulos iniciadores, todas

están conectadas a un mecanismo de control centrado en las mitocondrias. La radiación o la hipoxia, por ejemplo, producen la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial. La desregulación mitocondrial a su vez induce la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo C y la proteína Smac/DIABLO que activan a otro tipo de caspasa, la caspasa 9.

La tercera vía se produce por señales provenientes de linfocitos T citotóxicos. La activación de receptores de muerte celular programada como PD-1 (*programmed cell death protein 1*) induce la liberación de perforinas y granzimas que actúan sobre células infectadas con virus o células tumorales. Las perforinas forman poros en las células blanco a través de los cuales ingresan las granzimas. La granzima B induce la activación de la caspasa 10.

Las tres vías antes mencionadas convergen en la activación de la caspasa 3, una enzima que produce la fragmentación del ADN, la degradación de proteínas del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos que inducen el reclutamiento de células con capacidad fagocítica. (Carranza-Aguilar J. et al., 2020).

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte que puede darse tanto de forma accidental o no programada como de forma regulada. El primer caso ocurre cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido y someten a la célula a un estrés excesivo e incontrolable (por ejemplo, cambios de temperatura, estímulos mecánicos, sustancias químicas, hipoxia, radiaciones...). Cuando una célula se encuentra en estado necrótico presenta hinchamiento de orgánulos, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura temprana de la membrana plasmática y liberación «explosiva» del contenido citoplasmático al espacio extracelular.

La muerte celular necrótica accidental es un proceso pasivo que no requiere síntesis *de novo* de proteínas y emplea una cantidad mínima de energía. Se caracteriza por el aumento en el calcio intracelular (Ca^{2+}), la disfunción mitocondrial, el aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la proteólisis inducida por calpainas y catepsinas. Las calpainas son enzimas proteolíticas que tienen una cisteína en su sitio catalítico y su actividad depende de calcio. Las catepsinas son proteasas que requieren un medio ligeramente ácido para funcionar.

Por otro lado, la necrosis puede activarse por ligandos diferentes y está regulada por proteínas específicas. Las principales funciones de este tipo de muerte celular son: asegurar la eliminación de células infectadas por patógenos, promover un estado inflamatorio mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño e inducir el reclutamiento de células fagocíticas al

sitio de daño. Este tipo de muerte celular que estaría regulada se conoce como necroptosis y se produce por la activación de receptores de membrana como los tipo toll 3/4 (TLR3/4), o de algunos receptores de muerte (*death receptors*) (Galluzzi et al., 2012). La activación de estos receptores induce la activación de quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina (RIPKs, *receptor-interacting protein kinases*) y que interactúan con otros receptores. Las proteínas RIPK1 y RIPK3 se oligomerizan para formar un complejo intracelular denominado necroptosoma, el cual induce la activación de la proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*). Esta proteína se transporta a la membrana celular para inducir su ruptura y, en consecuencia, la liberación del contenido citoplasmático.

En diversos escenarios clínicos la necrosis se reporta como resultado de isquemia o daño tisular. Otros reportes indican que este tipo de muerte se presenta en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Carranza-Aguilar J. et al., 2020).

NETosis

Debido a su papel clave en la inmunidad innata y en una variedad de procesos patológicos, la NETosis, un tipo de muerte celular característica de los neutrófilos que presenta la extrusión de “trampas” extracelulares de neutrófilos (NETs), se ha convertido en un foco de investigación en la última década.

Las NETs son redes complejas de cromatina descondensada, histonas citrulinadas y péptidos antimicrobianos que son liberados por los neutrófilos en una variedad de condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Su formación y expulsión va acompañada de drásticos cambios morfológicos. Después de la estimulación, se activan cascadas de señalización dependientes del estímulo que inducen la descondensación de la cromatina, principalmente por degradación y/o modificación de histonas. Simultáneamente, la célula pierde sus membranas nucleares y granulares, degrada su citoesqueleto y se redondea. La cromatina se expande continuamente hasta que llena toda la célula y luego es expulsada a través de la ruptura de la membrana celular. En la mayoría de los escenarios estudiados, la producción de NETs representa una misión suicida, dejando morir al neutrófilo, mientras que la cromatina expulsada cumple su función designada en el espacio extracelular al combatir los patógenos intrusos (Neubert et al., 2020).

La muerte celular por NETosis es independiente de caspasas y se inicia cuando diversos ligandos endógenos o exógenos se unen a receptores TLR, receptores del complemento o receptores de citocinas. Dicha activación induce un incremento del calcio intracelular y la activación de la

proteína cinasa C (PKC) y de la enzima NADPH oxidasa (que es responsable del estallido oxidativo que se produce durante la activación de los neutrófilos). Estas proteínas promueven la producción de ROS, lo que contribuye a la ruptura de la envoltura nuclear. Estas señales activan a la enzima PAD4 que se transporta al núcleo y produce la citrulinación (conversión de arginina a citrulina, lo que conlleva a una alteración de la conformación espacial) de histonas y la descondensación de la cromatina (Carranza-Aguilar J. et al., 2020).

Mecanismos de formación de NETs

- Formación de NETs dependiente de NADPH-oxidasa (Nox):

Cuando se estimulan los neutrófilos con el agonista 4 β -forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), un mimético de diacilglicerol, las fuentes de calcio del retículo endoplásmico se liberan hacia el citosol. Este proceso facilita el ensamblaje de la enzima NADPH-oxidasa (Nox), impulsando así la generación de ROS, que posteriormente desintegran las membranas de los gránulos y del núcleo. De esta forma, las proteínas contenidas en los gránulos pueden interactuar con el núcleo donde pueden escindir las histonas y facilitar la descondensación de la cromatina. Este proceso culmina en la pérdida de la integridad de la membrana del neutrófilo y el ADN descondensado, que en este punto está decorado con contenido granular, se libera al medio extracelular para llevar a cabo funciones antimicrobianas (Ravindran et al., 2019).

- Formación de NETs independiente de NADPH-oxidasa (Nox):

Los ionóforos de calcio como el A23187, inducen la formación de NETs de forma independiente de Nox. Este provoca un aumento del flujo de iones de calcio del citosol hacia el núcleo de los neutrófilos, donde por acción de la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4), se eliminan los residuos de arginina de las histonas y se generan residuos de citrulina. Este proceso da como resultado la descondensación de la cromatina necesaria para la formación de NETs independientes de Nox. (Ravindran et al., 2019)

Como se ha comentado anteriormente, en los neutrófilos, la formación de NETs ocurre como respuesta a una variedad de estímulos, incluido el contacto con bacterias, virus, hongos y parásitos, así como ionóforos y mitógenos como PMA. Inicialmente, las NETs se describieron como una nueva estrategia de defensa inmunitaria, ya que se ha demostrado que inmovilizan e incluso matan bacterias. En este contexto, la inmovilización de patógenos y, por tanto, la prevención de su diseminación parece ser uno de los principales mecanismos de defensa de los neutrófilos. Por otro lado, por útiles que sean las NETs para el sistema inmunológico, su

producción parece tener importantes inconvenientes para el huésped debido a diferentes elementos citotóxicos que contienen y, por lo tanto, pueden causar un daño tisular significativo. Además, parecen estar involucrados en la patogénesis de un número creciente de enfermedades de gran relevancia, incluido el cáncer (Mollinedo, 2019).

Línea celular HL-60

Históricamente el estudio de los neutrófilos ha resultado un desafío por diversos motivos, entre los cuales se encuentran una vida media reducida en circulación (en torno a 6-12 horas), una extrema sensibilidad que dificulta su aislamiento, ya que son fácilmente activados y se alteran sus propiedades *in vivo* y la incapacidad que presentan para criopreservarlos y expandirlos *in vitro* debido a que no proliferan. Por estos motivos, la investigación de los neutrófilos debe basarse en células recién aisladas de sangre periférica de donantes humanos, lo que introduce una variación dependiente del donante en los datos experimentales y genera problemas de disponibilidad en un tiempo relativamente corto. Para contrarrestar estos problemas, los investigadores se han esforzado para desarrollar modelos celulares adecuados que permitan el estudio de estas células inmunitarias.

La línea leucémica HL-60 es la más extendida de las líneas mieloides utilizada como modelo de estudio de neutrófilos, y procede de una mujer de 36 años diagnosticada y tratada de leucemia aguda en el Hospital M. D. Anderson, en Texas. HL-60 es una línea celular en suspensión que prolifera relativamente rápido (tiempo de duplicación de unas 24h aproximadamente). Una gran ventaja de las células HL-60 es que son permisivas para una variedad de técnicas de edición genética, incluida la transducción lentiviral, la transfección con lipofectamina, la electroporación y la nucleofección.

Diferenciación de células HL-60 hacia neutrófilos

El crecimiento incontrolado y la falta de diferenciación en las células HL-60 dependen en gran medida del gen *c-Myc*. Este es un factor de transcripción que controla la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis. Si bien la expresión de *c-Myc* es alta en todas las células en proliferación, se regula rápidamente a la baja con la diferenciación terminal. No es de extrañar, por tanto, que se haya encontrado *c-Myc* desregulado en muchos tipos de cáncer (C. Wang et al., 2019). En las células HL-60, hay una amplificación genómica de más de diez veces de *c-Myc*,

que puede estar presente tanto dentro de los cromosomas como en estructuras extracromosómicas (Suleiman et al., 2020).

Un pequeño porcentaje de la población celular HL-60 se diferencia espontáneamente en células parecidas a granulocitos y se ha demostrado que estos granulocitos espontáneos tienen menos *c-Myc* que las mismas células indiferenciadas.

Uno de los compuestos más comúnmente utilizados para diferenciar las células HL-60 *in vitro* hacia el linaje de neutrófilos polimorfonucleares es el dimetilsulfóxido (DMSO) (D. Wang et al., 2020). Se sabe que este puede inducir un bloqueo de elongación de la transcripción del gen *c-Myc*. Además, el DMSO tiene la capacidad de eliminar las estructuras extracromosómicas que contienen el *gen c-Myc* amplificado. (Blanter et al., 2021)

Aunque las células HL-60 diferenciadas comparten muchas características funcionales de los neutrófilos maduros y son una herramienta de mucho valor en diferentes áreas de la biología de los neutrófilos, incluida la diferenciación y función de éstos, la capacidad de diferenciación de estas células en neutrófilos maduros es algo defectuosa. Esto queda demostrado por la incapacidad de las HL-60 de formar gránulos específicos (secundarios) y de gelatinasa (terciarios) y por mostrar diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión génica en relación con los neutrófilos de sangre periférica (Mollinedo et al., 2008).

Ureohidrolasa arginasa

La ureohidrolasa arginasa es una enzima que requiere del ion manganeso y que cataliza el paso final del ciclo de la urea para eliminar el amoníaco tóxico mediante la conversión de L-Arginina en L-Ornitina y urea. Se cree que la arginasa apareció primero en bacterias, pero ha persistido a lo largo de la evolución. La mayoría de las plantas, bacterias, levaduras e invertebrados tienen solo una isoforma arginasa, arginasa 2 (ARG2), y está ubicada en las mitocondrias. En cambio, la mayoría de los animales que metabolizan el exceso de nitrógeno como urea también expresan arginasa 1 (ARG1). Esta isoforma se expresa en el hígado, en los glóbulos rojos y en poblaciones de células inmunitarias específicas (PMNs), mientras que ARG2 se expresa en gran medida en el riñón y también en algunos otros tejidos, incluidos el cerebro y la retina. (Caldwell et al., 2018)

En este trabajo, es de especial interés la isoforma arginasa 1 debido a su relación con el sistema inmunitario y, en concreto, con los neutrófilos.

Arginasa 1

La isoforma arginasa 1 (ARG1, L-arginina ureolasa I, EC 3.5.3.1) en humanos comprende 322 aminoácidos, su masa atómica es de 35 kDa y consta de tres subunidades idénticas, por lo que forma un trímero. El sitio activo está ubicado en la parte inferior de una hendidura de 15 Å y la unión de iones de manganeso en la parte inferior de la hendidura es esencial para la actividad enzimática. El plegamiento de proteínas de cada subunidad pertenece a la familia α/β y consiste en una hoja β paralela de ocho hebras flanqueada por numerosas hélices α (Figura 3A) (Caldwell et al., 2018).

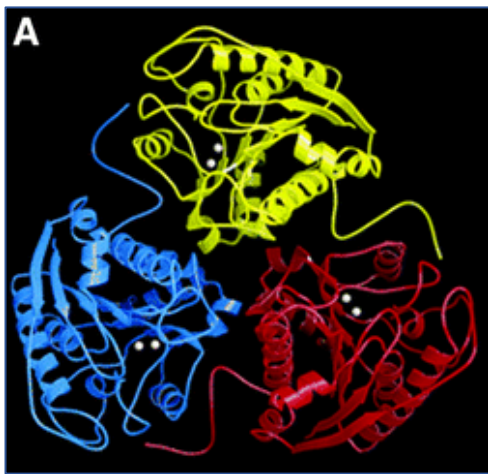


Figura 3 A: Diagrama de cinta del trímero de Arginasa 1 (de hígado). El grupo de manganeso binuclear está representado por un par de esferas en cada monómero. Imagen tomada de (Caldwell et al., 2018).

Funciones de la arginasa 1

La actividad de ARG1 tiene dos funciones fisiológicas principales entre las cuales se encuentra la desintoxicación del amoníaco en el ciclo de la urea y la producción de ornitina necesaria para la síntesis de prolina y poliaminas (Figura 4).

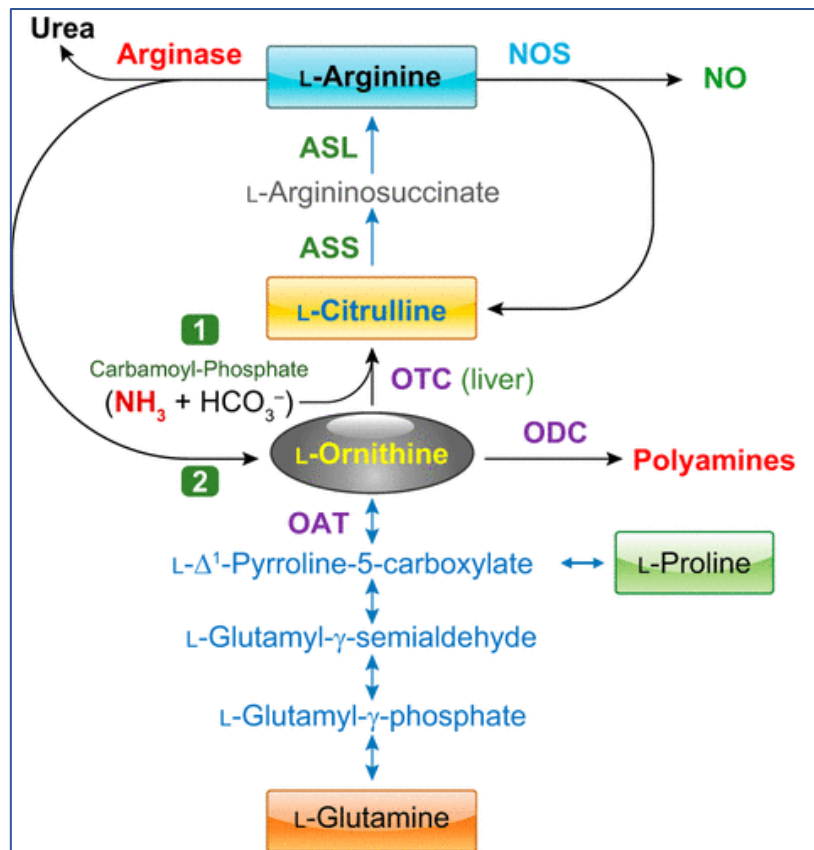


Figura 4. Vías metabólicas en la cuales está implicada la arginasa 1: Debido a la generación de L-ornitina, la arginasa está involucrada en varias vías metabólicas posteriores importantes. La L-Ornitina se puede metabolizar adicionalmente a poliaminas a través de la ornitina descarboxilasa (ODC). Las poliaminas son pequeñas moléculas catiónicas que participan en una variedad de funciones celulares fundamentales (por ejemplo, proliferación o transporte de la membrana celular). El metabolismo de la L-ornitina a través de la ornitina aminotransferasa (OAT) genera L-prolina, que es un componente esencial del colágeno. Alternativamente, la L-arginina sirve como sustrato para la óxido nítrico sintasa (NOS) que conduce a NO y otros intermedios de nitrógeno reactivo. La L-Arginina se puede reciclar de la L-Citrulina a través de la argininosuccinato sintasa (ASS) y la argininosuccinato liasa (ASL). *Imagen tomada de (Caldwell et al., 2018).*

Como se describe en la figura anterior, la arginasa 1 (ARG1) metaboliza la arginina en ornitina y, por lo tanto, reduce la arginina extracelular en los sitios de infección. Al agotar el sustrato de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), ARG1 conduce a una síntesis reducida de óxido nítrico (NO), que desempeña un papel fundamental en la cicatrización de heridas y las respuestas inmunitarias. Se ha demostrado, además, que el agotamiento de la arginina por ARG1 liberada de las células mieloides suprime las respuestas inmunitarias de las células T (Jacobsen et al., 2007). Finalmente, ARG1 genera el aminoácido ornitina a partir de arginina y la ornitina se puede metabolizar aún más a prolina y poliaminas, que mejoran la cicatrización de heridas al apoyar la síntesis de colágeno y la proliferación celular, respectivamente. Por lo tanto, el efecto de la actividad de ARG1 en el sitio de la infección es regular las respuestas inmunitarias y apoyar la regeneración tisular.

El papel de la arginasa 1 en el sistema inmunitario

El interés en la arginasa aumentó cuando se informó que la expresión de las dos enzimas degradantes de L-arginina en macrófagos (NOS y ARG1) estaba regulada por citocinas de células T. Específicamente, NOS es inducida por citocinas relacionadas con el tipo de respuesta inmunitaria T *helper* 1 (Th1), y la arginasa es inducible por citocinas típicas de respuestas Th2. (Katzenelenbogen et al., 2020)

Se ha demostrado que, entre los leucocitos, solo los neutrófilos expresan arginasa de forma constitutiva. Ahora bien, la citolocalización de esta enzima en los PMN sigue siendo controvertida. Algunos autores sugieren que está presente de forma constitutiva en los gránulos azurófilos (primarios) (Munder, 2009; Munder et al., 2005), mientras que otros sugieren que se encuentra en los gránulos de gelatinasa (terciarios) (Jacobsen et al., 2007).

La inflamación se asocia a menudo con inmunosupresión dentro del microambiente inflamatorio. Si bien la inmunosupresión inducida por inflamación probablemente ha evolucionado como un mecanismo homeostático para prevenir la destrucción excesiva de tejido durante la inflamación, podría ser perjudicial en situaciones de infección e inflamación asociada a tumores al impedir la eliminación del microorganismo o inhibir la citotoxicidad tumoral. Por tanto, un equilibrio alterado entre los sistemas efectores proinflamatorios y antiinflamatorios explica una amplia variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, cáncer e inmunopatologías asociadas con enfermedades infecciosas (Szefel et al., 2019).

Durante los últimos años, la expresión de arginasa y el agotamiento de L-arginina han surgido como una vía inmunosupresora poderosa del sistema inmunológico de los mamíferos, ya que una de las principales características de la disfunción inmunológica provocada por la inflamación es un profundo deterioro de las respuestas inmunitarias mediadas por células T (Czystowska-Kuzmicz et al., 2019), provocado por el agotamiento de L-arginina (aminoácido esencial) mediado por la arginasa, liberada por los neutrófilos. (Munder et al., 2006)

Debido a los conocimientos que se comentaron anteriormente, buscar un tratamiento farmacológico relacionado con la arginasa parece ser altamente prometedor para el tratamiento del cáncer, la autoinmunidad y la inmunosupresión no deseada, ya que esta enzima parece actuar como un actor clave en el sistema inmunológico (Holmström & Hasselbalch, 2019; Mitcheltree et al., 2020).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los resultados anteriores en el campo de investigación de interés mostraron que los neutrófilos humanos expresaron constitutivamente altas cantidades de arginasa 1. Esta arginasa se almacena en gránulos citoplasmáticos intracelulares, pero la localización subcelular exacta sigue siendo controvertida (Jacobsen et al., 2007; Munder et al., 2005). Una vez que se libera la arginasa de los neutrófilos, se agota la arginina extracelular y se suprimen las funciones de las células T. La línea celular de leucemia aguda humana HL-60 se puede diferenciar en células terminales similares a los neutrófilos que no proliferan y son propensas a la apoptosis, y constituye un buen modelo para examinar diferentes procesos moleculares relacionados con los neutrófilos, incluida la secreción y la muerte celular.

Debido a que las HL-60 se pueden diferenciar en neutrófilos en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO), planteamos la hipótesis de que las HL-60 podrían ser un buen modelo para estudiar diferentes aspectos relacionados con la localización y función de la arginasa en los neutrófilos humanos y cómo esta enzima se libera durante la activación celular y/o la muerte celular, incluida la NETosis. Para ello, nos interesa desarrollar un modelo de cultivo celular de células HL-60, una herramienta interesante para facilitar estos estudios.

Por lo tanto, planeamos realizar los siguientes objetivos:

1. Establecer la diferenciación de células HL-60 hacia células de tipo neutrófilo.
2. Determinación de la presencia de arginasa 1 en células HL-60 y durante el proceso de diferenciación celular hacia células de tipo neutrófilo.
3. Determinación de la localización subcelular de la arginasa 1 en neutrófilo.
4. Validación de células HL-60 diferenciadas en neutrófilo como modelo para estudiar muerte celular y procesos de NETosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD11b Bear-1, proporcionado por el doctor J.E De Vries, Unicet, Lyon, France.
- Sobrenadante del mieloma P3X63 (utilizado como control negativo), cedido por el Dr. F. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid.
- Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)
- Arginase 1 α -human recombinant rabbit monoclonal antibody (Thermo Fisher)
- Horseradish peroxidase (HRP)-linked goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling)

Reactivos y otros productos

- Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640, de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, USA).
- Suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina, penicilina, estreptomina y gentamicina, de Life Technologies, Inc.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), de Merck (Darmstadt, Alemania).
- 4 β -forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), de Sigma.
- Ionóforo A23187, de Sigma.
- Ficoll Hypaque, de Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Suecia).
- Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆), de Sigma.
- Formaldehido, de Baker Chemicals B. V. (Deventer, Holanda).
- Detector de quimioluminiscencia Amersham™ ECL™ (GE Healthcare).
- SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher).
- Membranas Hydrophobic Immobilion-P PVDF (Merck Millipore).
- ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).
- Yoduro de Propidio (IP), de Sigma.

Equipos

- Citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter)
- Chemidoc™ Imaging System (BioRad)
- Microscopio confocal Láser (CLSM) LEICA TCS SP5

Modelos celulares

Línea celular HL-60

Se trabajó con la línea celular leucémica HL-60 mencionada anteriormente (ver punto 2 de la introducción).

Dichas células se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.), la principal organización mundial de estándares y recursos de materiales biológicos cuya misión se centra en la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales.

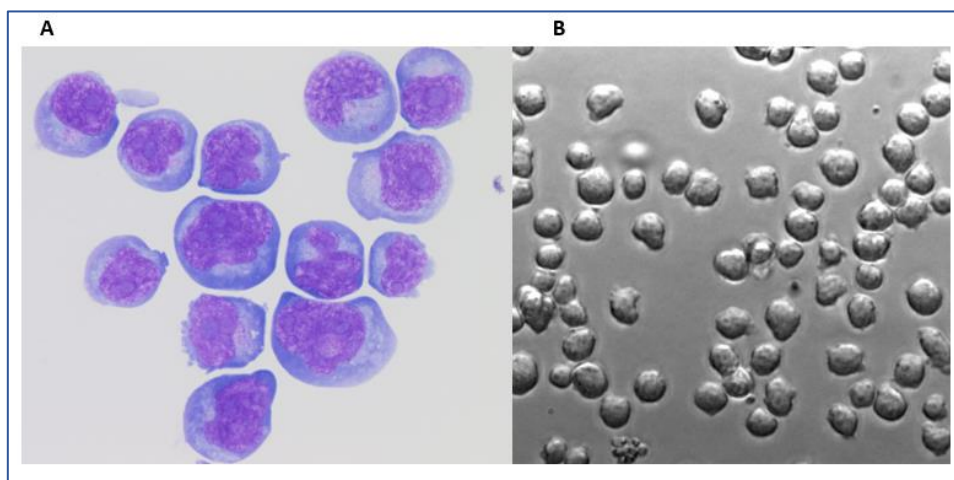


Figura 5. (A) Morfología celular y forma nuclear de células HL-60 indiferenciadas (evaluadas mediante tinción Wright-Giemsa). (B) Cultivo celular de la línea HL-60 (células en suspensión) (Dakir & Mollinedo, 2019)

Neutrófilos de sangre periférica humana

Las bolsas de extracción de sangre periférica humana fueron cedidas amablemente por pacientes del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, después de realizarse sangrías para reducir la cantidad de glóbulos rojos de la sangre en aquellas enfermedades que se asocian con una excesiva cantidad de estos como poliglobulias o con una elevada cantidad de hierro (hemocromatosis).

Enfoque experimental

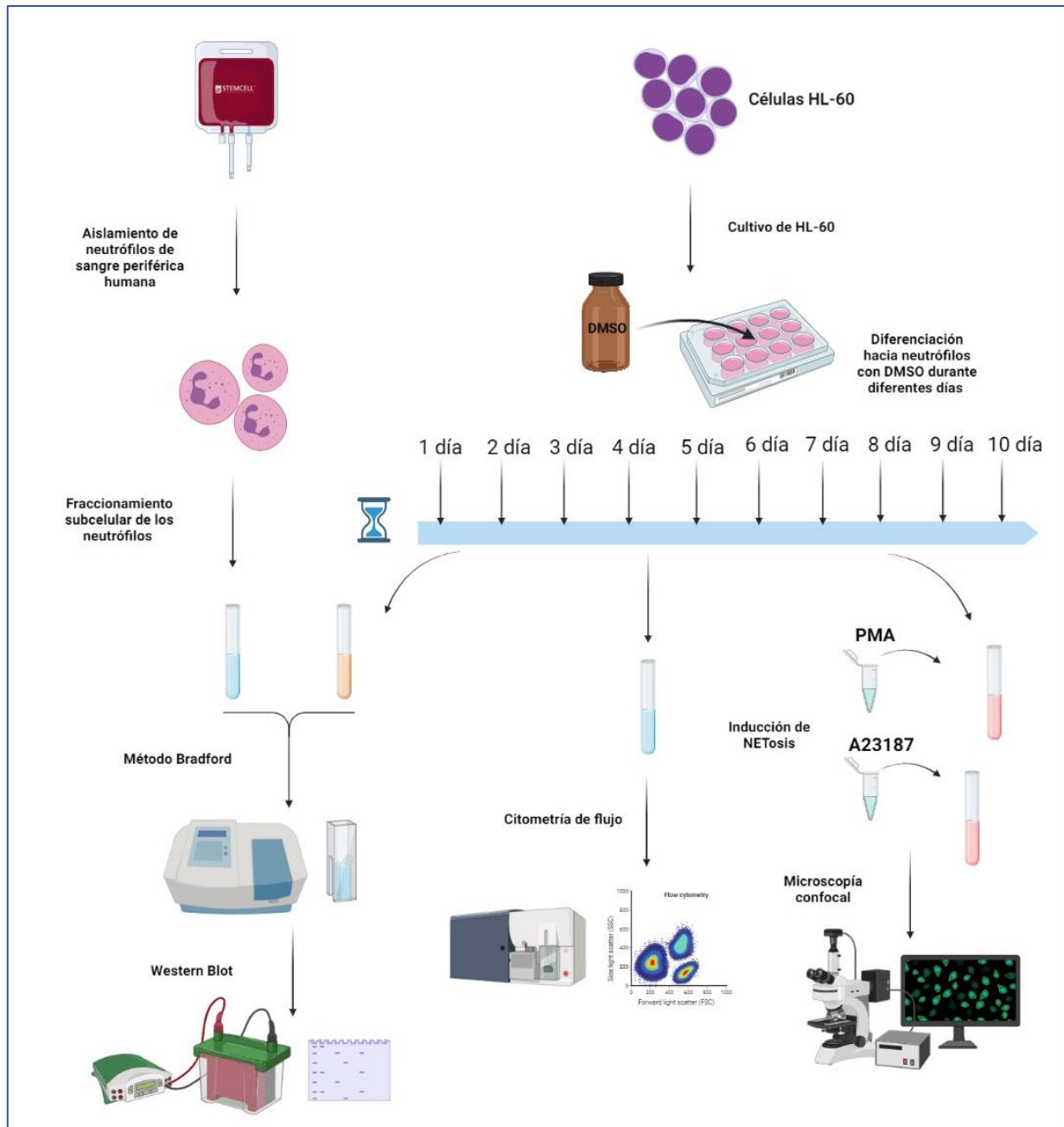


Figura 6. Diagrama de flujo de todos los experimentos realizados.

Cultivo celular

Las células HL-60 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (FCS) pre-inactivado por calor al 10% (v/v), 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/streptomina y 2,5 mg/mL de ciprofloxacina. Las células HL-60 proliferan continuamente en suspensión a 37°C en una atmósfera humidificada de aire / CO₂ (19:1), con un tiempo de duplicación de unas 20-30h.

La diferenciación neutrofílica de las células HL-60 se indujo incubando con 1,3% (v/v) DMSO y se recogieron las células tratadas a los 5, 6, 7, 8 y 9 días después del tratamiento con DMSO.

Determinación del antígeno de superficie celular CD11b/CD18

La expresión del antígeno de superficie celular CD11b/CD18 se analizó mediante citometría de flujo de inmunofluorescencia. Brevemente, los sedimentos celulares de un pocillo se recogieron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los sedimentos celulares se resuspendieron con 100 µl de PBS y se añadió 65 µl del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD11b (Mo1 Bear-1). Como control negativo se añadieron 65 µl de sobrenadante de mieloma P3X63 en otro tubo tratado de forma similar. Después se incubó 1 hora a 4°C y se realizó otro lavado con PBS con una posterior centrifugación donde se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µl junto con 1 µl del anticuerpo secundario Alexa 488-anti IgG de ratón. Se resguardó de la luz y se incubó 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con PBS, se centrifugó y se añadieron 400 µl de formaldehído (37%) para fijar las células (las células fijadas y almacenadas de esta manera pueden analizarse mediante citometría de flujo incluso 2 semanas después). Finalmente, se evaluó la expresión del antígeno CD11b en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter).

Determinación de la viabilidad celular mediante incorporación de Yoduro de Propidio (IP)

Para corroborar el resultado de las células positivas para CD11b durante la diferenciación de neutrófilos se excluyeron las células muertas mediante el uso de IP. Brevemente, los sedimentos celulares de un pocillo se recogieron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, se añadieron 400 µl de PBS junto con 2 µl de IP (1 mg/mL). Finalmente se evaluó la fluorescencia emitida en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). (Esta medida se realizó en células en fresco).

Determinación del potencial de membrana mitocondrial (DiOC₆)

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó utilizando el tinte fluorescente yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆). Brevemente, se incubaron las células durante 30 minutos a 37°C, se realizó una centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió DiOC₆ a 0,5 nM con RPMI. Posteriormente, se volvieron a incubar las células a 37°C durante 30 minutos, se realizó otra centrifugación a 1200 rpm durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con PBS. Finalmente, se evaluó la fluorescencia emitida por el DiOC₆ en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). (Esta medida se realizó en células en fresco).

Determinación del ciclo celular

Con el propósito de estudiar las distintas fases del ciclo celular y la cantidad de células apoptóticas se realizó un análisis del ciclo celular. Brevemente, los sedimentos celulares de un pocillo se recogieron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, se añadieron 700 µl de etanol (70%) y se incubaron a 4°C. Se realizó otra centrifugación (1200 rpm, 5 minutos) y se añadieron 400 µl de una solución de 5 µl de RNAsa, 5 µl de IP y 390 µl de PBS 1x. Las distintas fases del ciclo celular se determinaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter).

Cuantificación proteica

A las células obtenidas se les añadió una solución de lisis con un inhibidor de proteasas (1:200). Se resuspendieron bien las células en presencia de hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 18 minutos. Se recogió el sobrenadante rico en proteínas y a medida de la concentración proteica se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se trata de un método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a proteínas. Se utilizó la solución comercial Kit Protein Assay (BioRad, Richmond, CA, USA), y la cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (Sigma).

Western Blot

Las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. La medida del contenido de proteína fue realizada con el ensayo de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Richmond,

CA, USA) y 10 µg de proteínas eran separadas mediante geles del 12% SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras. Las proteínas se transferían posteriormente a membranas y se sometían a detección inmunológica. Un patrón de proteínas preteñidas estándar de alto rango (Bio-Rad), eran también sometidas a electroforesis en el mismo gel. Después de la electrotransferencia y bloqueo durante una hora con un 5% de leche desnatada en el tampón TBS (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl), las membranas eran incubados toda la noche 4°C con su respectivo anticuerpo específico (anti-arginasa 1 IgG de conejo: dilución 1:5000) en el tampón TBS conteniendo 1% Tween20 (TBS-T). A continuación, se realizó otra incubación con el anticuerpo secundario HPR-linked anti-IgG de conejo (1:1000) durante 1 hora. Se realizaron varios lavados con TBS-T 1x entre paso y paso. El revelado se observó en un sistema de imagen ChemiDoc™ (BioRad) utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia de Amersham ECL™ (GE Healthcare) y alternativamente SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher).

Aislamiento de neutrófilos

Los neutrófilos se obtenían a partir de sangre periférica humana después y se sedimentaban los eritrocitos en 1,3% de dextrano a temperatura ambiente. El sobrenadante rico en leucocitos se centrifugaba a 1200 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendía en PBS y se centrifugaba sobre Ficoll-Hypaque, a 1500 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente para separar las células mononucleares de los granulocitos. El sedimento rico en neutrófilos se suspendía en de PBS y la posible contaminación con eritrocitos se lisaba mediante un choque hipotónico por adición de agua destilada e incubación durante 1 minuto. La isotonicidad era inmediatamente restaurada por adición de NaCl a 0.15M y los neutrófilos se sedimentaban por centrifugación durante 10 minutos. La lisis se repetía si era necesaria para conseguir una suspensión de neutrófilos que estuviera libre de eritrocitos.

Fraccionamiento subcelular de neutrófilos

Se siguió un protocolo publicado para el fraccionamiento subcelular de neutrófilos en reposo (Martin-Martin et al., 2000; Mollinedo et al., 2006). Para preparar las distintas fracciones subcelulares, se rompieron suavemente neutrófilos y la fracción posnuclear se colocó en capas sobre un gradiente continuo de sacarosa de 27 ml, 15-40% (p/p), con una almohadilla de 1 ml de sacarosa al 60% (p/p), y se centrifugó a 25.000 rpm durante 10 minutos en una ultracentrífuga Beckman L8-70B utilizando un rotor SW27.

Inducción de la NETosis en HL-60

Se cultivaron y recolectaron $1,26 \cdot 10^6$ células HL-60 según el protocolo citado anteriormente (DMSO 1,3% (v/v) a los 5 días), se centrifugaron y se resuspendieron separándose en dos grupos diferentes: uno con RPMI con 10% de FCS y otro en RPMI sin FCS. Posteriormente, se prepararon soluciones madre de PMA (50 nM) y A23187 (4 μ M) en dimetilsulfóxido y se indujo la NETosis. Ambos grupos se dejaron incubar con los inductores durante 30 min y 4 horas a 37°C para ver la diferencia de la variante del tiempo en la inducción y se trasladaron a un portaobjetos. Se pusieron brevemente en un termobloque a 37°C para ayudar a la adhesión al portaobjetos y, posteriormente, se fijaron con formaldehído (37%) con PBS durante 20 min. Finalmente, se le añadió DAPI para marcar el ADN. Se resguardó de la luz a 4°C y se visualizó a través de microscopia confocal.

RESULTADOS

1. Las células HL-60 constituyen un buen modelo para la diferenciación en neutrófilos

La línea celular leucémica mielóide humana HL-60 se puede diferenciar en células que muestran muchas de las características de los neutrófilos maduros después del tratamiento con DMSO al 1,3% (v/v).

1.1. Adquisición del antígeno leucocitario CD11b/CD18 (Mo1 o Mac1)

Una manera rápida de monitorear la diferenciación de neutrófilos por parte de la línea celular HL-60 es mediante la expresión de un marcador presente en los neutrófilos humanos. La expresión en la superficie celular del antígeno leucocitario CD11b, la subunidad α del antígeno CD11b/CD18, también denominado Mo1 o Mac1, representa la diferenciación hacia células polimorfonucleares ya que las células HL-60 indiferenciadas carecen de CD11b. Este antígeno también se presenta en las células monocito/macrófagos, pero se puede utilizar como parámetro de diferenciación de neutrófilos en células HL-60 tratadas con DMSO (Mollinedo et al., 2008).

Para ello, se requiere citometría de flujo de inmunofluorescencia para analizar la expresión de antígenos leucocitarios en la superficie celular (Rincón et al., 2018). Como control negativo se utilizó el sobrenadante del cultivo de mieloma P3X63, que no reconoce ningún antígeno de superficie celular. A continuación, se muestran los datos representativos correspondientes a los días 0, 5 y 10 de tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) para inducir la diferenciación de HL-60 en neutrófilos.

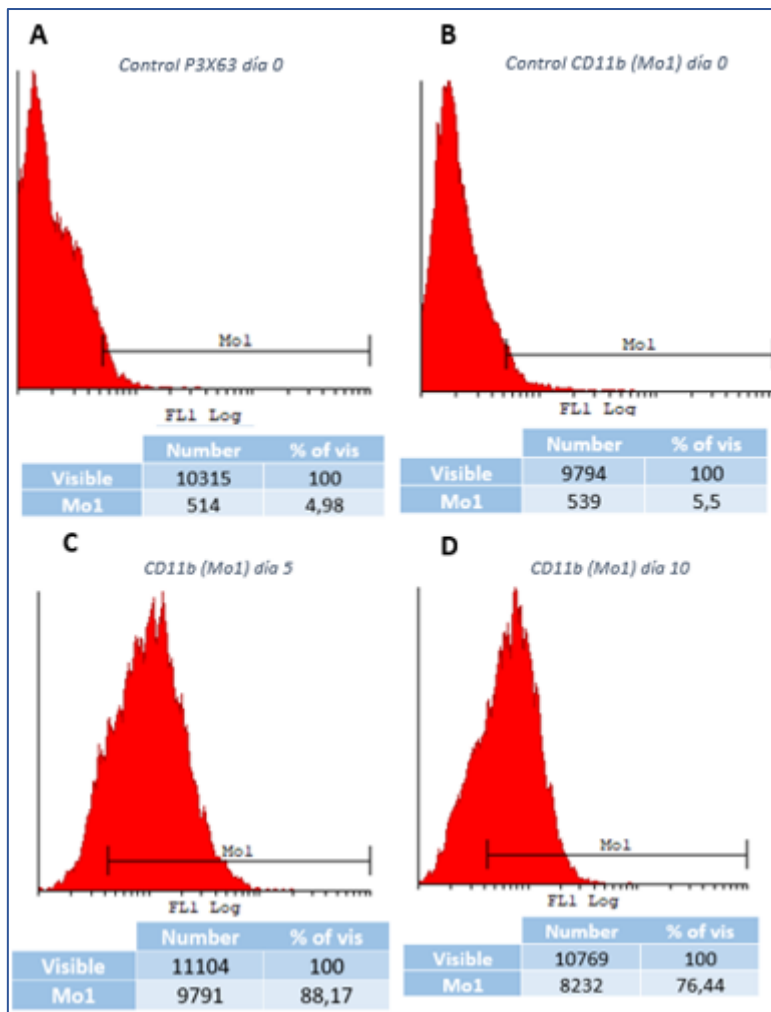


Figura 7. Expresión del antígeno de superficie celular CD11b/CD18 (Mo1) en células HL-60 durante la diferenciación en neutrófilos: Mediante citometría de flujo se estudió la expresión del antígeno leucocitario CD11b/CD18 (Mo1) durante la diferenciación granulocítica de células HL-60 en neutrófilos. Se recolectaron células HL-60 a los días indicados (B, C, D), después del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) y se realizó un estudio de la expresión del antígeno de superficie característico de células polimorfonucleares (Mo1) así como del sobrenadante de mieloma utilizado como control negativo P3X63 (A). Se utilizó el software *Cyflow* para analizar los datos obtenidos.

1.2. Disminución de la viabilidad celular analizada mediante IP

Para corroborar el resultado de las células positivas para CD11b durante la diferenciación de neutrófilos se determinó el porcentaje de células muertas, generalmente por necrosis o NETosis mediante el uso de IP. Este fluorocromo no puede atravesar las membranas celulares intactas, pero cuando la célula muere debido a los procesos de muerte comentados anteriormente, que afectan a la superficie celular, la membrana se vuelve permeable y el IP puede atravesarla y teñir el ADN. La fluorescencia roja resultante observada a través de citometría de flujo es proporcional al contenido de ácido nucleico. Mediante este método es posible discriminar entre células vivas no fluorescentes y células fluorescentes muertas por procesos necróticos o de

necrosis secundaria (necrosis que se detecta tras una respuesta apoptótica prolongada en el tiempo). A continuación, se muestran los datos representativos correspondientes a los días 0, 5 y 10 de tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) para inducir la diferenciación de HL-60 en neutrófilos.

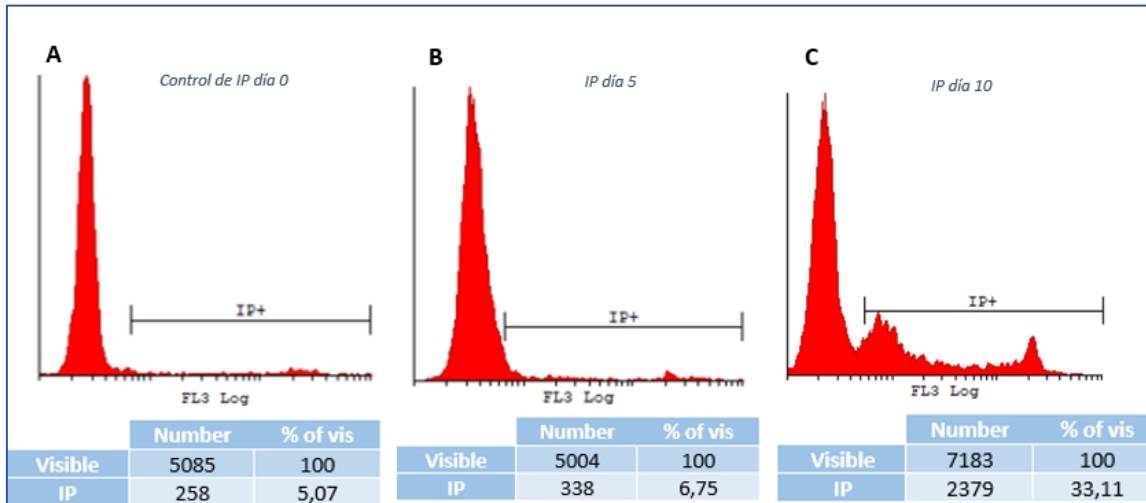


Figura 8. Estudio de la viabilidad celular mediante el fluorocromo IP: Mediante citometría de flujo se estudió la muerte celular producida por los procesos de muerte necróticos y por NETosis durante la diferenciación granulocítica de células HL-60 en neutrófilos. Se recolectaron células HL-60 a los días indicados (A, B, C), después del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) y se incubaron con el fluorocromo IP. Se utilizó el software *Cyflow* para analizar los datos obtenidos.

1.3. Disminución del potencial de membrana mitocondrial como consecuencia de la muerte celular

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es generado por el gradiente de protones (H^+) entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). El potencial mitocondrial de las células en condiciones normales es alto y constante, pero disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias. Para la medida de este potencial se utilizó la sonda fluorescente verde lipofílica yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina ($DiOC_6$) que está cargada positivamente, por lo que se acumula en la matriz mitocondrial de las células viables. Cuando desciende el valor del potencial, es decir, en las primeras etapas de la apoptosis, desciende la cantidad de sonda retenida en la matriz, disminuyendo la fluorescencia (Nash et al., 2020). A continuación, se muestran los datos representativos correspondientes a los días 0, 5 y 10 de tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) para inducir la diferenciación de HL-60 en neutrófilos.

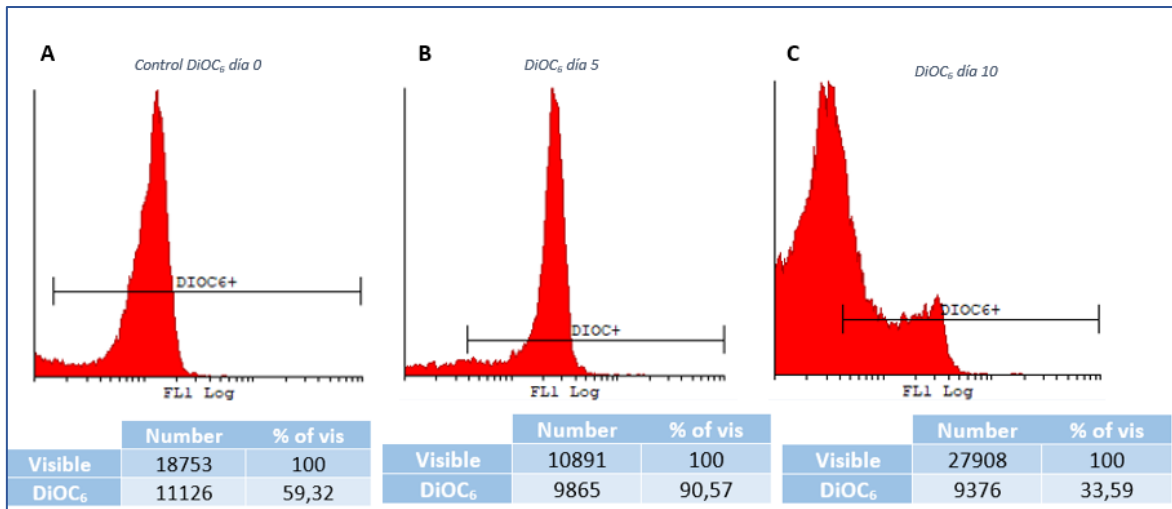


Figura 9. Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda fluorescente DiOC₆: Mediante citometría de flujo se estudió la muerte apoptótica durante la diferenciación granulocítica de células HL-60 en neutrófilos. Se recolectaron células HL-60 a los días indicados (A, B, C), después del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) y se incubaron con DiOC₆. Se utilizó el software *Cyflowic* para analizar los datos obtenidos.

1.4. Ciclo celular

Con el propósito de estudiar las distintas fases del ciclo celular y la cantidad de células apoptóticas se realizó un análisis del ciclo celular. La apoptosis se cuantificó mediante la aparición del pico subG₀/G₁. El arresto de células en fase G₀/G₁ se utilizó como indicador de la diferenciación de HL-60 hacia neutrófilos, ya que son células terminales no proliferantes que se acumulan en la fase G₀/G₁ y no producen síntesis de DNA ni se dividen (no se encuentran en fase S, G₂/M).

En la *Figura 10* se aprecia que tras 10 días de incubación con DMSO se produce un leve incremento en el porcentaje de células en la región subG₀/G₁, indicando el inicio de la respuesta apoptótica. Este porcentaje se incrementa aumentando el tiempo de incubación con DMSO.

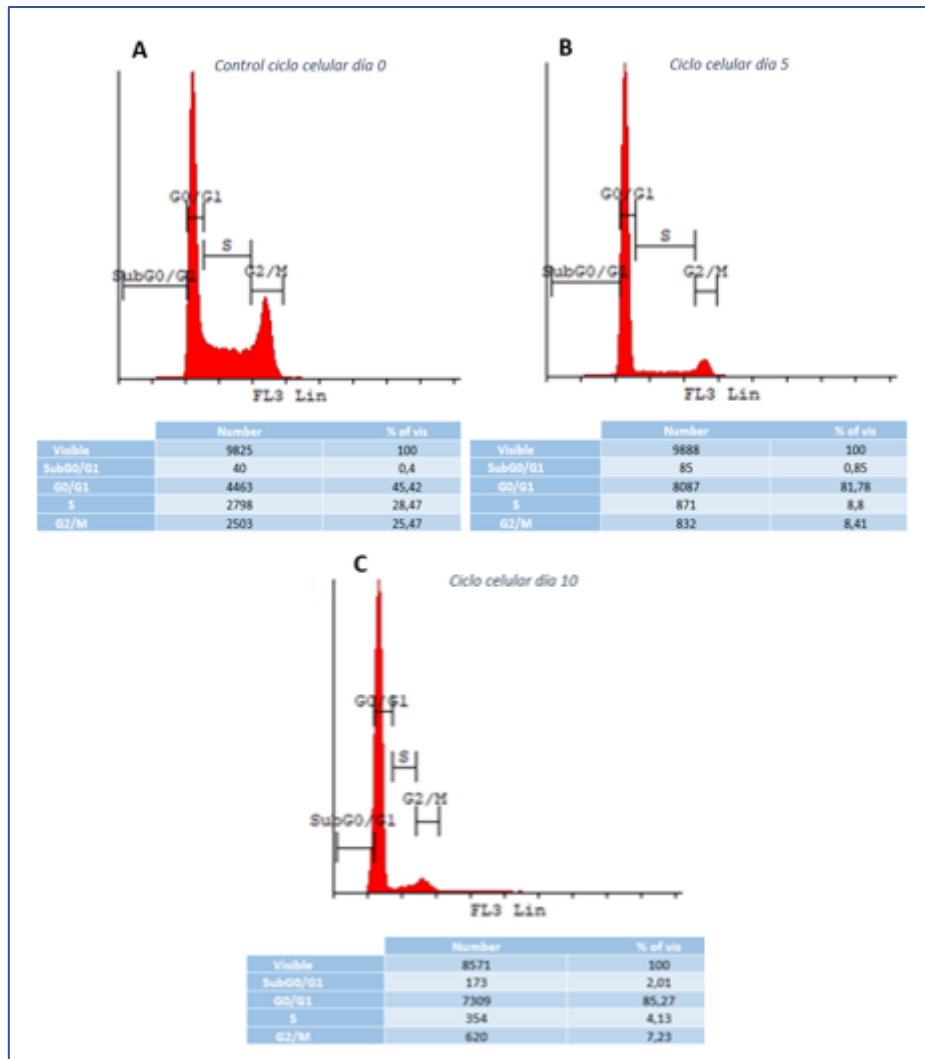


Figura 10. Análisis del proceso de muerte apoptótica a través del ciclo celular: Mediante citometría de flujo se estudió la muerte apoptótica durante la diferenciación granulocítica de células HL-60 en neutrófilos. Se recolectaron células HL-60 a los días indicados (A, B, C), después del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v), se incubaron con etanol y se les añadió RNasa, IP y PBS. Se utilizó el software *Cyflagic* para analizar los datos obtenidos.

2. La arginasa está presente en células HL-60 diferenciadas en neutrófilos en muy baja concentración

Para determinar la presencia de arginasa 1 en células HL-60 y durante el proceso de diferenciación celular hacia células de tipo neutrófilo se cultivaron células HL-60 con 1,3% (v/v) DMSO y se analizó la presencia de arginasa 1 en los días 0 y 5 mediante Western Blot.

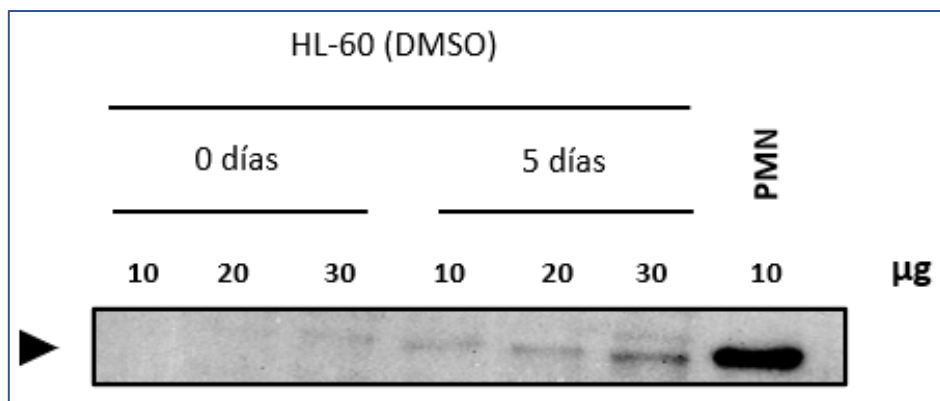


Figura 11. Expresión de arginasa 1 en células HL-60 incubadas con DMSO 1,3% (v/v): Se estudió la expresión de arginasa mediante Western Blot. Se cultivaron células HL-60 con DMSO 1,3% para inducir la diferenciación granulocítica (días 0 y 5). Distintas cantidades de proteína (10,20 y 30 µg) de extractos de HL-60 sin tratar (día 0) y tratadas con DMSO (5día) se analizaron por Western Blot. Se empleó como control el neutrófilo (10 µg de proteína total).

3. arginasa 1 está presente en los gránulos azurófilos y no en el citosol de los neutrófilos

Para realizar la determinación subcelular de la arginasa 1 en neutrófilo se realizó la extracción de neutrófilos de sangre periférica y se obtuvieron las fracciones celulares de esos neutrófilos. Después de realizar el método Bradford de cuantificación proteica, se pudo realizar un Western Blot de las fracciones subcelulares E (fracción postnuclear), N (fracción nuclear), 1 (citosol), 8 (gránulos azurófilos y restos celulares), debido a que, durante el fraccionamiento subcelular, el resto de las fracciones dieron valores de proteína muy bajos que impidieron determinar la presencia o ausencia de arginasa 1 en ellas.

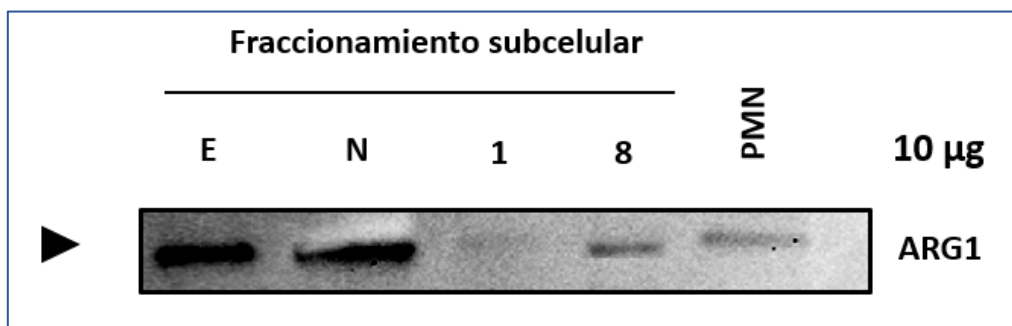


Figura 12. Expresión de arginasa 1 en las fracciones subcelulares de los neutrófilos: Se estudió la expresión de arginasa mediante Western Blot. Se obtuvo sangre periférica humana y se aislaron los neutrófilos, que se sometieron a fraccionamiento subcelular mediante gradiente de sacarosa. Se cuantificaron los extractos proteicos de cada fracción y se sometieron a electroforesis 10 µg de las fracciones E (postnuclear), N (nuclear), 1 citosol) y 8 (gránulos azurófilos y restos celulares). Se utilizó como control 10 µg de proteína total del neutrófilo sin fraccionar.

4. Las células HL-60 diferenciadas en neutrófilos producen un artefacto después de la inducción de la NETosis pero no resisten al calor

Para determinar si las HL-60 diferenciadas en neutrófilo (día 5 de tratamiento con DMSO) eran un buen modelo para estudiar la NETosis, se incubaron con dos inductores de este proceso de muerte característica del neutrófilo: PMA (datos no mostrados) y A23187 y se visualizaron través de microscopía confocal.

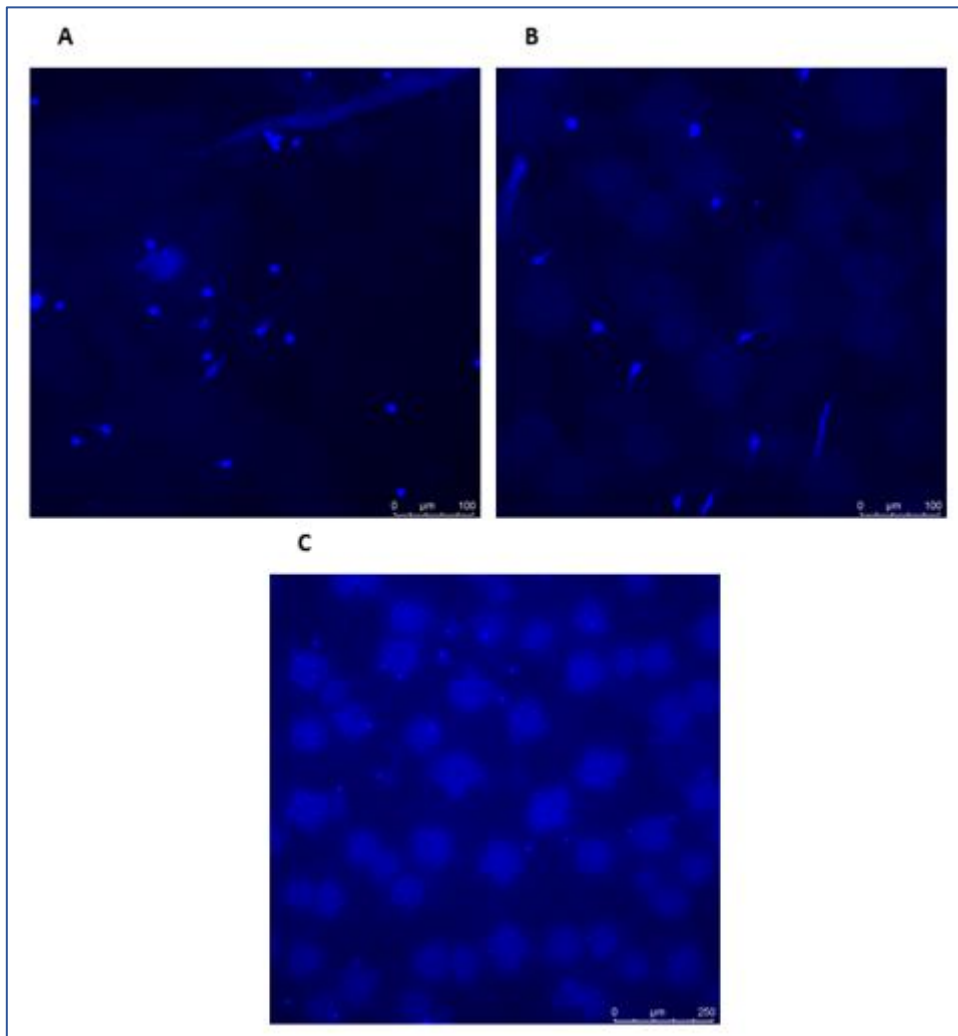


Figura 13. Estudio de la inducción de NETosis en HL-60 diferenciadas en neutrófilos: Se recolectaron células HL-60 al 5 día después del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) y se incubó con el inductor de NETosis A23187 (4 μ M) en DMSO durante 30 min (B) y 4 horas (C) y se calentaron a 37°C, para ayudar a la fijación de células a portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina, antes de ser fijadas con formaldehído 37% con PBS. Se añadió DAPI y se visualizó en microscopía confocal. **A:** Control con 10% FCS. **B:** A23187 con 10% FCS 30 minutos. **C:** A23187 con 10% FCS 4 horas.

CONCLUSIONES

Resumiendo los resultados aquí presentados y los publicados anteriormente, podemos concluir que:

1. Las células HL-60 constituyen un buen modelo para diferenciación en células de tipo neutrófilo ya que a través del tratamiento con DMSO 1,3% (v/v) adquieren las características típicas de estas células polimorfonucleares como la adquisición del antígeno de superficie leucocitario CD11b/CD18 (Mo1), presente en neutrófilos y ausente en células HL-60 sin diferenciar, se producen procesos de muerte, generalmente por apoptosis a tiempos largos de diferenciación, y mediante la incubación con el inductor de la diferenciación detienen su ciclo celular en G0/G1, convirtiéndose en células terminales sin capacidad de síntesis de ADN ni de división.
2. La arginasa 1 está presente en células HL-60 diferenciadas hacia neutrófilos, pero su concentración no es comparable a la de una célula polimorfonuclear neutrofílica madura de sangre periférica, por lo que utilizar HL-60 diferenciada en neutrófilo como modelo para estudiar la implicación de esta proteína en neutrófilos podría plantear algunos problemas debido a su baja expresión, por lo que parece que sería necesaria la expresión ectópica de esta enzima.
3. La arginasa 1 está presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, pero este resultado no es definitivo para acabar con la controversia generada sobre la localización subcelular de la arginasa ya que, debido a una baja concentración proteica, no se ha podido analizar la presencia de esta enzima en otros gránulos (como los gránulos terciarios, donde otros estudios anteriores la han localizado).
4. No se ha podido establecer un protocolo de detección y estudio de la inducción de NETosis en células HL-60 diferenciadas hacia neutrófilos, ya que se han detectado formas probablemente artefactuales tras la incubación con calor para favorecer la fijación de células a portaobjetos. No obstante, la presencia de estos posibles artefactos resultó distinta en las muestras tratadas con un posible inductor de NETosis tras un tiempo de incubación prolongado y a tiempos cortos de incubación, siendo notablemente menos intensos en los tiempos cortos de incubación.

DISCUSIÓN

La necesidad de estudiar aspectos relacionados con los neutrófilos ha crecido exponencialmente en las últimas décadas debido a los hallazgos que relacionan elevados niveles de NLR y un mal pronóstico de ciertas enfermedades, entre ellas el cáncer (Fang et al., 2020; Mollinedo, 2019). Debido a ello, se ha puesto el foco en el estudio de los neutrófilos y su implicación en la inflamación y el desarrollo de ciertas patologías. Este tipo de células polimorfonucleares son células terminales de vida corta, altamente sensibles, se activan fácilmente, y no se dividen, por lo cual no se pueden cultivar *in vitro*. Por todo ello, el estudio de neutrófilos se vería altamente potenciado mediante el establecimiento y uso de modelos celulares adecuados que permitan el estudio de estas células inmunitarias. De ahí nace el primer objetivo del presente estudio, establecer la diferenciación de una de esas líneas celulares (HL-60) en neutrófilos. Los resultados obtenidos durante el proceso de diferenciación de células HL-60 en PMNs, inducidas con DMSO 1,3%, muestran que estas células adquieren numerosas características de las células inmunitarias.

En primer lugar, las células HL-60 carecen del antígeno de superficie leucocitario CD11b/CD18 (Mo1), característico de neutrófilos, como se muestra en la *figura 7B* donde no se ha inducido la diferenciación granulocítica con DMSO (día 0), y la señal del antígeno Mo1 analizada es del 5,5%, una señal inespecífica relacionada con el valor establecido como control negativo (*figura 7A*) mediante el sobrenadante de mieloma P3X63 que tiene la característica de no unirse a ningún antígeno conocido. En cambio, una vez se produce la inducción de la diferenciación hacia células de tipo neutrófilo, se produce un aumento de CD11b ya en el día 5 de tratamiento (Mo1 se expresa un 88,17%, *figura 7C*). A medida que pasan los días, esta expresión se mantiene o disminuye muy sutilmente en el día 10 de tratamiento, donde se observa una expresión del 76,44% del antígeno de superficie leucocitario (*figura 7D*), que puede deberse a una consecuencia del proceso apoptótico que sufren las células durante ese día de diferenciación. Por tanto, se puede concluir que la diferenciación hacia células de tipo neutrófilo se ha producido en la gran mayoría de las células.

Mediante el uso de IP se determinó si la incubación con DMSO inducía algún proceso de permeabilización de la superficie celular o de muerte celular a través de procesos de necrosis o NETosis, ya que en estos tipos de muerte celular se produce una alteración de las membranas celulares que permite que el fluorocromo IP las atraviese y tiña el ADN. Eso no ocurre cuando las células mantienen la membrana celular intacta, ya sea porque están vivas o porque han muerto por procesos apoptóticos, ya que no se produce una desestabilización de la membrana. En este aspecto se observa una disminución de la viabilidad celular, a tiempos muy prolongados

de diferenciación celular, ya que en las células no diferenciadas hay una señal del 5,07% de muerte (*figura 8A*), debido a la muerte natural de todas las células, en las células tratadas con DMSO durante 5 días aumenta, pero no significativamente, la muerte producida por los procesos comentados (6,75%, *figura 8B*) y en el último día analizado durante la diferenciación, sí aumenta el porcentaje de células muertas por necrosis o NETosis (33,11% de células positivas para IP en el día 10 de diferenciación, *figura 8C*).

Otro aspecto que demuestra la diferenciación de las células HL-60 en neutrófilos es la adquisición de la muerte apoptótica, por ello se ha estudiado este proceso a través del potencial de membrana mitocondrial, que disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias. La cantidad de la sonda fluorescente DiOC₆ retenida en la matriz mitocondrial de las células viables permite discriminar las células muertas por apoptosis. En los resultados obtenidos, se observa que en las células HL-60 sin diferenciar, el porcentaje de células positivas para DiOC₆ es del 59,32% (*figura 9A*), pero en el día 5 de tratamiento se produce una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, que llega hasta el 90,57% de células positivas para DiOC₆ (*figura 9B*). Esta hiperpolarización, que debería ser confirmada con la repetición de varios experimentos, podría deberse a cambios metabólicos y energéticos que tendrían lugar tras el paso de una célula leucémica proliferante a una célula terminal no proliferante, aunque se desconoce qué procesos podrían llegar a este nuevo estado de hiperpolarización y su posible función. Tras el día 10 de tratamiento con DMSO, el porcentaje de células positivas para DiOC₆ desciende hasta el 33,59% de células positivas para la sonda de marcaje, lo que indica que el porcentaje de células apoptóticas ha aumentado ya que ha disminuido el potencial de membrana mitocondrial, y con él, la fluorescencia. Esta pérdida del potencial de membrana mitocondrial precede al inicio de apoptosis.

Por otro lado, una característica presente frecuentemente en las células en apoptosis es la ruptura o escisión del ADN en fragmentos internucleosomales. Mediante el análisis del ciclo celular se puede detectar ese nivel apoptótico celular y el estado de las células respecto al ciclo. En cuanto a las células apoptóticas se pueden detectar como células con baja tinción para el ADN en el pico subG0/G1. Además, el análisis del ciclo celular permite cuantificar la diferenciación de células HL-60 en neutrófilos, ya que los segundos tienen la característica de ser células terminales, es decir, su ciclo celular finaliza en G0/G1, ya que no sintetizan copias de ADN ni se dividen (no entran en fase S ni G2/M), a diferencia de las células HL-60 que sí tienen esa capacidad. En los resultados obtenidos durante el análisis del ciclo celular se ha tenido en cuenta el pico subG0/G1 para determinar el porcentaje de células que han sufrido muerte por apoptosis y se ha observado un aumento de dicho porcentaje en relación con la inducción de la

diferenciación. En el día 0 de tratamiento, donde las células HL-60 no fueron diferenciadas con DMSO, se observa un porcentaje del pico subG0/G1 del 0,4% (*figura 10A*), en el día 5 de diferenciación ese porcentaje aumenta al 0,85% (*figura 10B*) y, finalmente, en el décimo día de diferenciación se observa un porcentaje de células que se encuentran en el pico SubG0/G1 del 2,01% (*figura 10C*), lo que sugiere que la respuesta apoptótica se inicia alrededor de este tiempo de incubación. Transcurrido este tiempo, el porcentaje de células subG0/G1 se va incrementando con el aumento de los días de incubación (datos no mostrados), lo que indica que el proceso apoptótico va teniendo lugar en las células ya totalmente diferenciadas.

En cuanto a los picos G0/G1, S y G2/M la diferencia entre células HL-60 sin diferenciar y células HL-60 diferenciadas en neutrófilos es significativamente grande. En las células sin diferenciar (*figura 10A*) el porcentaje de células que se encuentran en G0/G1 es de 45,42%, el de S es 28,47% y el de G2/M de 25,47%. En cambio, las células diferenciadas en los días 5 y 10 generalmente se encuentran en la fase G0/G1 (81,78% y 85,27%, respectivamente: *figuras 10B y C*).

A través de estos resultados se ha caracterizado la diferenciación granulocítica de las células HL-60 en neutrófilos, y ha quedado demostrado que estas células adquieren características típicas de las células neutrofílicas al inducir su diferenciación con DMSO 1,3% (v/v). Entre esas características se encuentra que las células HL-60 diferenciadoras adquieren un antígeno de superficie típico de PMNs, CD11b/CD18 (Mo1), se detienen en G0/G1 durante la diferenciación hacia el linaje de neutrófilos y adquieren la capacidad de sufrir apoptosis espontánea después de la diferenciación completa de neutrófilos.

Por otra parte, otro de los focos de estudio en los últimos años ha sido la implicación de la arginasa 1 en el sistema inmunitario. Esta enzima liberada por los neutrófilos promueve el agotamiento del aminoácido esencial L-arginina, que provoca un enorme deterioro de las respuestas inmunitarias mediadas por células T, lo cual, a su vez, constituye una vía inmunosupresora en el sistema inmunológico (Czystowska-Kuzmicz et al., 2019). Por ello, nos preguntamos si el modelo celular HL-60 sería un buen modelo productor de arginasa al diferenciarse a neutrófilo, ya que facilitaría enormemente el estudio de la implicación de la arginasa derivada de neutrófilos en distintos procesos en los que el neutrófilo está implicado. Para ello, después del cultivo y diferenciación de HL-60 en neutrófilo se estudió la presencia de arginasa 1. Los resultados mostrados en la *figura 11* demuestran que durante el proceso de diferenciación las células HL-60 adquieren la capacidad de expresar arginasa, pero comparada con el control de neutrófilo, no lo hacen en una concentración deseable para realizar estudios de función de la enzima. Se observa como añadiendo hasta una concentración proteica de 30

$\mu\text{g/mL}$ en células HL-60, la banda mostrada es mucho menos intensa que el control de neutrófilo (que contenía $10 \mu\text{g/mL}$ de proteína). Sí que se observa un aumento respecto a las células sin diferenciar que podría sugerir que esta enzima se produce como consecuencia de la diferenciación, pero esto sigue sin ser suficiente para realizar estudios significativos a partir de este modelo celular. De esta forma, estudios adicionales, incluyendo expresión a nivel de RNA y proteína, deberían llevarse a cabo para determinar de forma concluyente la capacidad real que presentan las células HL-60 de expresar arginasa durante la diferenciación hacia neutrófilos en comparación hacia su diferenciación a otros linajes. Así, también se podrían realizar ensayos de transfección de arginasa y determinar la expresión de esta enzima durante la diferenciación granulocítica, a fin de determinar la relación de expresión de arginasa, localización subcelular y diferenciación a células con características de neutrófilos.

Respecto a los resultados mostrados anteriormente, podemos extraer que la línea celular HL-60 proporcionan una alternativa para el aislamiento de neutrófilos frescos de la sangre, pero no puede reemplazar por completo esas células. Por eso, los hallazgos nuevos siempre deberán confirmarse en experimentos finales con las células primarias (Blanter et al., 2021).

Es sabido que las células HL-60 diferenciadas en neutrófilos no presentan dos de los gránulos característicos de estas células inmunitarias (gránulos específicos o secundarios y gránulos de gelatinasa o terciarios), por lo tanto, intentar resolver la controversia generada por la localización subcelular de la arginasa 1 mediante este modelo de cultivo no sería lo óptimo (Jacobsen et al., 2007; Munder, 2009; Munder et al., 2005; Rotondo et al., 2011). Debido a ello, se intentó dilucidar la localización subcelular de la arginasa en neutrófilos a través de un fraccionamiento subcelular de neutrófilos. Debido a una muy baja concentración proteica en las fracciones subcelulares aisladas de neutrófilos de sangre periférica, no se pudieron someter todas las fracciones subcelulares al análisis de arginasa, pero se consiguió observar cómo esta enzima estaba posiblemente presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, tal y como observaron otros investigadores (Munder et al., 2005; Rotondo et al., 2011). Este resultado se muestra en la *figura 12*, donde la banda 8 representa la fracción subcelular de los gránulos azurófilos o primarios. Posiblemente este resultado indique que la arginasa 1 se encuentre ubicada en esos gránulos, pero también habría la posibilidad de que, en esa fracción, al ser la última obtenida, fueran a parar restos celulares además de los gránulos azurófilos. De todos modos, se observa claramente cómo la enzima está presente en esa fracción, pero esto no sería suficiente para acabar con la polémica de la localización de la arginasa 1 debido a que, otros investigadores afirman que se encuentra en los gránulos de gelatinasa o terciarios y en nuestro estudio ha sido imposible evaluar la fracción subcelular perteneciente a esos gránulos, como se

ha comentado anteriormente, debido a la pequeña concentración proteica obtenida tras el fraccionamiento subcelular de los neutrófilos. Por tanto, podríamos concluir que la arginasa 1 parece que está ausente en el citosol, mientras que está presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos; pero sería necesario realizar más estudios con la combinación de las mismas fracciones derivadas de varios fraccionamientos subcelulares (y de distintos tipos de fraccionamientos subcelulares), y concentración de las proteínas obtenidas en las distintas fracciones, para determinar si únicamente se encuentran en ellos o, por el contrario, hay otros compartimentos subcelulares que la contienen.

Centrándonos en otro aspecto, desde un punto de vista clínico, comprender los procesos que subyacen a la formación de NETs es de gran importancia (Hamam & Palaniyar, 2019), ya que la formación aberrante de NETs parece ser un factor clave en la patogenia de una serie de enfermedades, principalmente las enfermedades autoinmunes y las enfermedades cardiovasculares, así como la progresión del cáncer y la metástasis (Huang et al., 2020; Neubert et al., 2020). Por esa parte, tener un buen conocimiento molecular del proceso de formación de NETs y del proceso de muerte celular característico de los neutrófilos, mediante el cual son expulsadas (NETosis), constituye un objetivo de gran interés, y con posibles repercusiones en distintos aspectos fisiológicos y patológicos. En este estudio se indujo la NETosis en células HL-60 diferenciadas durante 5 días con DMSO para determinar si este modelo celular podría sustituir a los neutrófilos en los estudios de expresión y liberación de NETs. Para ello se utilizaron los inductores de NETosis PMA y A23187 y se siguió un protocolo de determinación de fluorescencia en células no adherentes (Gajate & Mollinedo, 2021). Desgraciadamente, se obtuvo una respuesta artefactual tras el análisis por microscopía confocal de células HL-60 diferenciadas hacia neutrófilos con DMSO sin tratar y tratadas con el ionóforo A23187 durante 30 minutos y 4 horas (*figura 13B y C*). En estas imágenes se observa la inducción de un artefacto producido presumiblemente por el inductor de NETosis a tiempos largos. Las HL-60 diferenciadas no soportaron una exposición breve al calor para facilitar su adhesión inicial al portaobjetos y, por eso, no se ha podido observar la imagen esperada y característica de la expulsión del ADN del proceso de NETosis. Por ello, se debería poner a punto un protocolo específico para determinar la inducción de este proceso de muerte celular, a fin de determinar si el modelo celular HL-60 permite el estudio de NETs y de su proceso de liberación en neutrófilos.

En resumen, en este estudio hemos sido capaces de determinar la diferenciación de la línea celular HL-60 hacia el linaje de neutrófilos, así como determinar que no parece ser un modelo óptimo para el estudio de la expresión y función de la enzima arginasa 1 en neutrófilos humanos,

debido a su baja expresión en el modelo de cultivo celular. Además, hemos determinado que la arginasa 1 está ausente en el citosol y está presente, al menos, en los gránulos azurófilos de los neutrófilos; pero hemos sugerido que podría no ser el único almacenamiento granular de neutrófilos que la contenga.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedouhène, S., Dang, P. M. C., Hurtado-Nedelec, M., El-Benna, J. (2020). Neutrophil Degranulation of Azurophil and Specific Granules. *Methods in Molecular Biology*, 2087, 215–222. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_16
- Blanter, M., Gouwy, M., & Struyf, S. (2021). Studying neutrophil function in vitro: Cell models and environmental factors. *Journal of Inflammation Research*, 14, 141–162. <https://doi.org/10.2147/JIR.S284941>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Caldwell, R. W., Rodriguez, P. C., Toque, H. A., Priya Narayanan, S., Caldwell, R. B. (2018). Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, 98, 641–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>
- Czystowska-Kuzmicz, M., Sosnowska, A., Nowis, D., Ramji, K., Szajnik, M., Chlebowska-Tuz, J., *et al.*, (2019). Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma. *Nature Communications*, 3000, 5-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10979-3>
- Fang, T., Wang, Y., Yin, X., Zhai, Z., Zhang, Y., Yang, Y., *et al.*, (2020). Diagnostic Sensitivity of NLR and PLR in Early Diagnosis of Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1-9 <https://doi.org/10.1155/2020/9146042>
- Gajate, C., Mollinedo, F. (2021). Lipid raft isolation by sucrose gradient centrifugation and visualization of raft-located proteins by fluorescence microscopy: The use of combined techniques to assess fas/cd95 location in rafts during apoptosis triggering. *Methods in Molecular Biology*, 2187, 147–186. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0814-2_9
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107-120. <https://www.nature.com/articles/cdd201196>

- Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Hamam, H. J., & Palaniyar, N. (2019). Post-translational modifications in netosis and nets-mediated diseases. *Biomolecules*, 9, 1-8. <https://doi.org/10.3390/biom9080369>
- Holmström, M. O., & Hasselbalch, H. C. (2019). Cancer immune therapy for myeloid malignancies: present and future. *Seminars in Immunopathology*, 41, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0693-x>
- Huang, H., Zhang, H., Onuma, A. E., Tsung, A. (2020). Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1263, 13–23. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44518-8_2
- Iwai, N., Okuda, T., Sakagami, J., Harada, T., Ohara, T., Taniguchi, M., *et al.*, (2020). Neutrophil to lymphocyte ratio predicts prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Scientific Reports*, 10, 69–75. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75745-8>
- Jacobsen, L. C., Theilgaard-Mönch, K., Christensen, E. I., Borregaard, N. (2007). Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood*, 109, 3084–3087. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-032599>
- Javier Carranza-Aguilar, C., Karen Ruiz-Quiñonez, A., González-Espinosa, C., Cruz-Martín-del-Campo, S. L. (2020). Revisión-Opinión El Residente Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *Scientific Reports*, 15, 97-112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- Kang, J., Chang, Y., Ahn, J., Oh, S., Koo, D. H., Lee, Y. G., *et al.*, (2019). Neutrophil-to-lymphocyte ratio and risk of lung cancer mortality in a low-risk population: A cohort study. *International Journal of Cancer*, 145, 3267–3275. <https://doi.org/10.1002/ijc.32640>
- Katzenelenbogen, Y., Sheban, F., Yalin, A., Yofe, I., Svetlichnyy, D., Jaitin, D. A., *et al.*, (2020). Coupled scRNA-Seq and Intracellular Protein Activity Reveal an Immunosuppressive Role of TREM2 in Cancer. *Cell*, 182, 872-885 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.032>
- Khandia, R., & Munjal, A. (2020). Interplay between inflammation and cancer. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 119, 199–245. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.09.004>

- Martin-Martin, B., Nabokina, S. M., Blasi, J., Lazo, P. A., & Mollinedo, F. (2000). Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood*, 96, 2574–2583. <https://doi.org/10.1182/blood.v96.7.2574>
- Mitcheltree, M. J., Li, D., Achab, A., Beard, A., Chakravarthy, K., Cheng, M., *et al.*, (2020). Discovery and Optimization of Rationally Designed Bicyclic Inhibitors of Human Arginase to Enhance Cancer Immunotherapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11, 582–588. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00058>
- Mollinedo, F. (2019). Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis. *Trends in Immunology* 40, 228–242. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.006>
- Mollinedo, F., Calafat, J., Janssen, H., Martín-Martín, B., Canchado, J., Nabokina, S. M., *et al.*, (2006). Combinatorial SNARE Complexes Modulate the Secretion of Cytoplasmic Granules in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 177, 2831–2841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2831>
- Mollinedo, F., López-Pérez, R., Gajate, C. (2008). Differential gene expression patterns coupled to commitment and acquisition of phenotypic hallmarks during neutrophil differentiation of human leukaemia HL-60 cells. *Gene*, 419, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.015>
- Munder, M. (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system: REVIEW. *British Journal of Pharmacology* 158, 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
- Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamagnere, C., Fuentes, J. *et al.*, (2005). Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 105, 2549–2556. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2521>
- Munder, M., Schneider, H., Luckner, C., Giese, T., Langhans, C. D., Fuentes, J. M., *et al.*, (2006). Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, 108, 1627–1634. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-010389>
- Munir, H., Jones, J. O., Janowitz, T., Hoffmann, M., Euler, M., Martins, C. P., *et al.*, (2021). Stromal-driven and Amyloid β -dependent induction of neutrophil extracellular traps modulates tumor growth. *Nature Communications*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20982-2>

- Nash, A., Samoylova, M., Leuthner, T., Zhu, M., Lin, L., Meyer, J. N., *et al.*, (2020). Effects of Immunosuppressive Medications on Mitochondrial Function. *Journal of Surgical Research*, 249, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.12.010>
- Neubert, E., Meyer, D., Kruss, S., & Erpenbeck, L. (2020). The power from within - Understanding the driving forces of neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Science* 133, 5-14. <https://doi.org/10.1242/JCS.241075>
- Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil extracellular trap formation: Physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules* 9, 8-17. <https://doi.org/10.3390/biom9080365>
- Rincón, E., Rocha-Gregg, B. L., Collins, S. R. (2018). A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. *Journal of Inflammation Research* 19, 1-9 <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4957-6>
- Rotondo, R., Bertolotto, M., Barisione, G., Astigiano, S., Mandruzzato, S., Ottonello, *et al.*, (2011). Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*, 89, 721–727. <https://doi.org/10.1189/jlb.1109737>
- Suleiman, S., Di Fiore, R., Cassar, A., Formosa, M. M., Schembri-Wismayer, P., *et al.*, (2020). Axolotl *Ambystoma mexicanum* extract induces cell cycle arrest and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Tumor Biology*, 42, 1-9. <https://doi.org/10.1177/1010428320954735>
- Szczerba, B. M., Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkountela, S., Landin, J., *et al.*, (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*, 566, 553-557. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y>
- Szefel, J., Danielak, A., & Kruszewski, W. J. (2019). Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Advances in Medical Sciences* 64, 104-110. Medical University of Bialystok. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.08.018>
- Wang, C., Yang, Y., Zhang, G., Li, J., Wu, X., Ma, X., *et al.*, (2019). Long noncoding RNA EMS connects c-Myc to cell cycle control and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 14620–14629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903432116>

Wang, D., Sennari, Y., Shen, M., Morita, K., Kanazawa, T., Yoshida, Y. (2020). ERK is involved in the differentiation and function of dimethyl sulfoxide-induced HL-60 neutrophil-like cells, which mimic inflammatory neutrophils. *International Immunopharmacology*, 84, pp. 785-793) <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106510>

AUTOEVALUACIÓN

Recuerdo el proceso de la búsqueda de las prácticas y de un lugar en el que desarrollar mi trabajo de final de grado de forma difusa, es como si mi mente quisiera olvidarse de los nervios y de la incerteza de no saber si iba a encontrar un sitio donde poder crecer tanto académicamente como personalmente. Por primera vez iba a enfrentarme al mundo laboral, a conocer de primera mano un laboratorio y a ver si me gustaba de verdad aquello por lo que tanto había estudiado. Cuando recibí la noticia de que, a pesar de las dificultades y de la distancia, podría ir a realizar las prácticas en el laboratorio del Dr. Faustino, pensé que todo el esfuerzo había valido la pena, pensé que esa oportunidad que se me presentaba debía aprovecharla al máximo.

Durante mi estancia en el laboratorio he entendido lo complejo que es llevar a cabo una investigación, des del momento de recopilar información como trabajo previo, a la implicación que supone desarrollar cada experimento. He entendido que como en todo, se necesita constancia y dedicación y me he cerciorado de que voy por buen camino, de que la biomedicina es un tema apasionante y del cual quiero formar parte. Ver cómo era capaz de relacionar los conocimientos que he ido adquiriendo durante estos años de estudio, con el trabajo que realizaba en el laboratorio y los resultados que obtenía, a la vez que adquiriría conocimientos nuevos, ha supuesto una motivación para continuar en lo que me gusta.

No todo ha sido fácil, obviamente. El ritmo frenético que he llevado combinando las prácticas, las asignaturas y los trabajos, sumado al hecho de estar a 500 km de mi casa y en medio de una pandemia, muchas veces ha supuesto un esfuerzo tanto físico como mental enorme. Pero creo que esto me ha hecho reconocer mis puntos débiles y crecer en todos los aspectos, adquirir nuevas responsabilidades y desarrollar por completo mi capacidad de organización.

Estoy muy satisfecha del resultado del trabajo, de las experiencias que he vivido, de terminar esta etapa tan fructífera en mi vida para empezar una nueva y, sobre todo, de hacerlo con muchas ganas.

ANEXOS

Anexo 1. Citometría de flujo

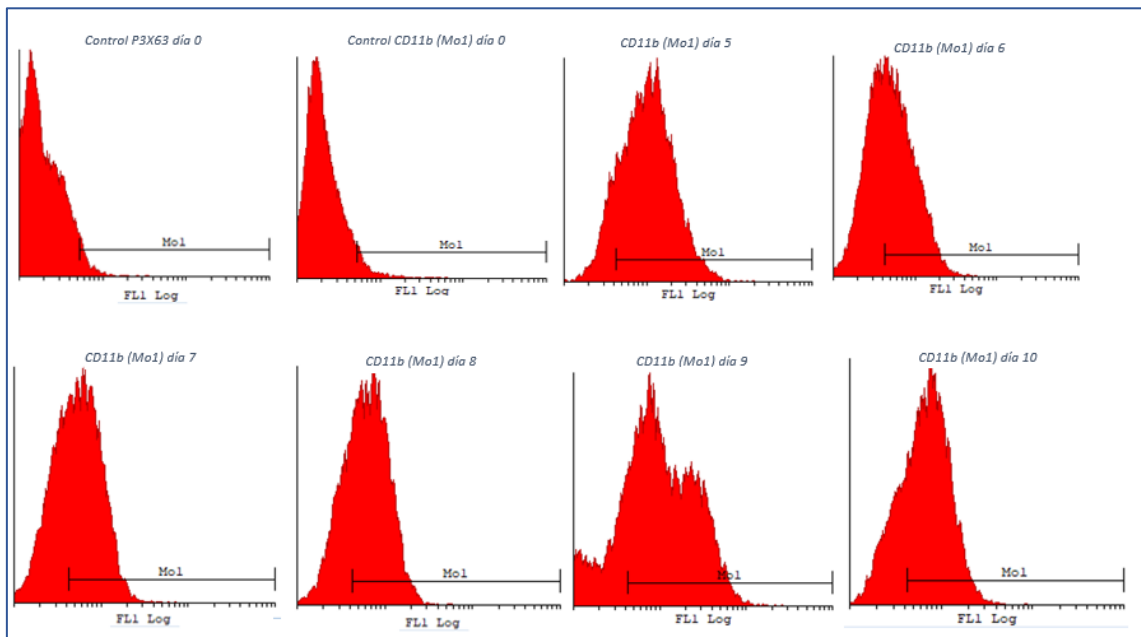


Figura A1: Expresión del antígeno de superficie celular CD11b/CD18 (Mo1) en células HL-60 durante la diferenciación en neutrófilos (datos completos). (Descrito en el apartado 1.1. de los resultados).

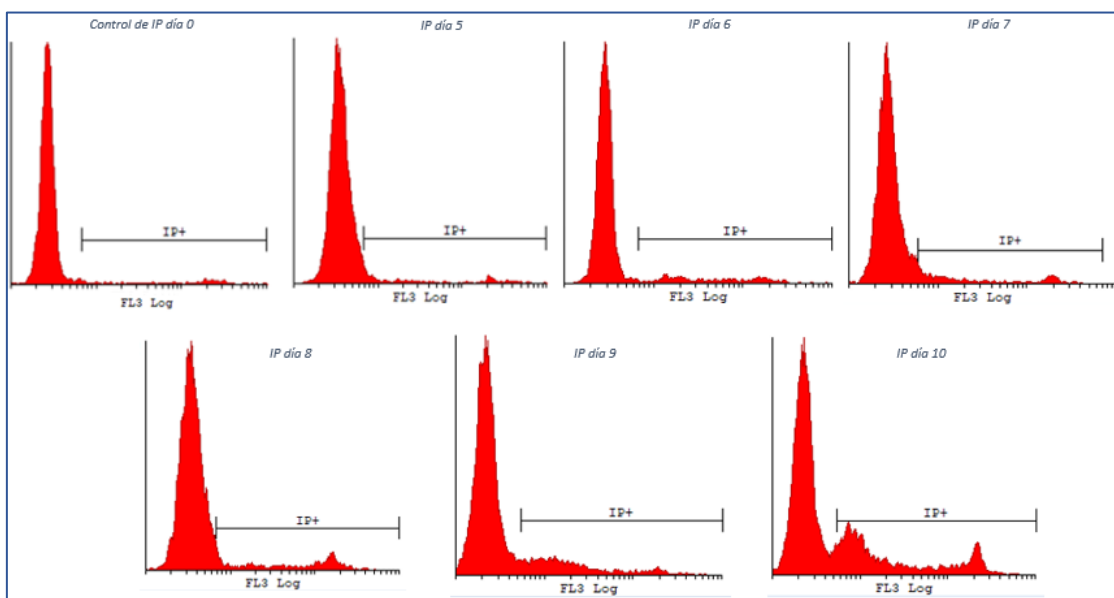


Figura A2: Estudio de la viabilidad celular mediante el fluorocromo IP (datos completos). (Descrito en el apartado 1.2. de los resultados).

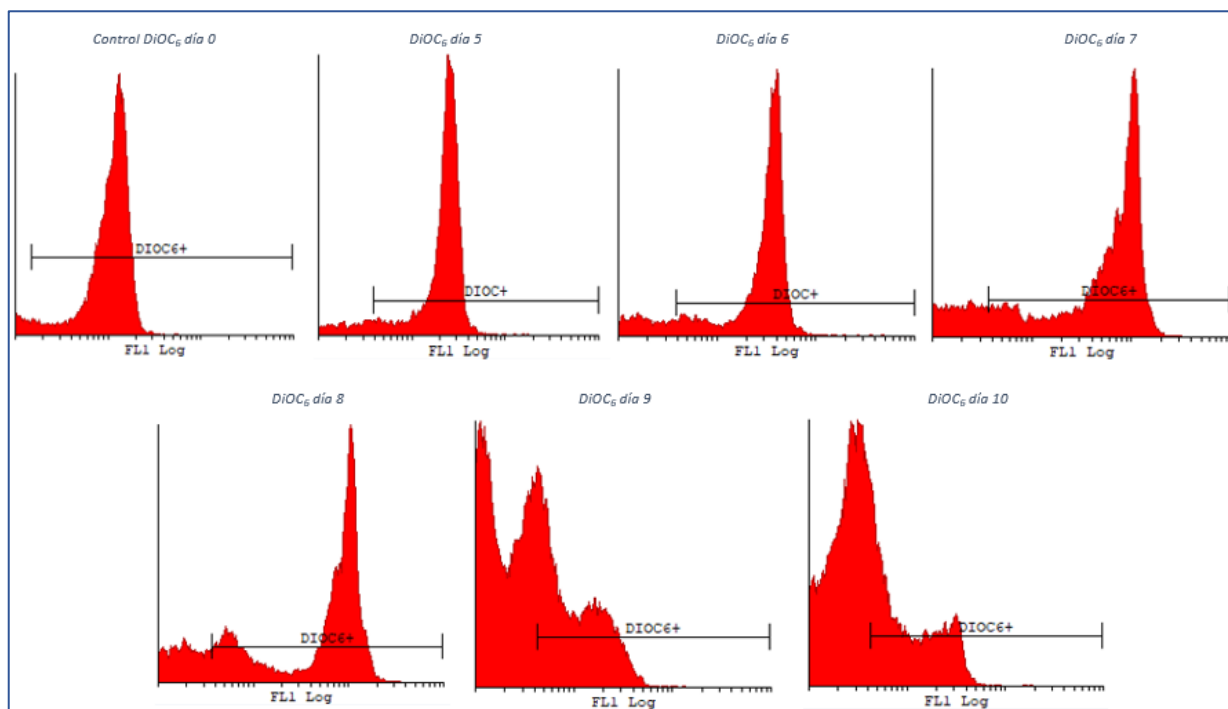


Figura A3: Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda fluorescente DiOC₆ (datos completos). Descrito en el apartado 1.3. de los resultados).

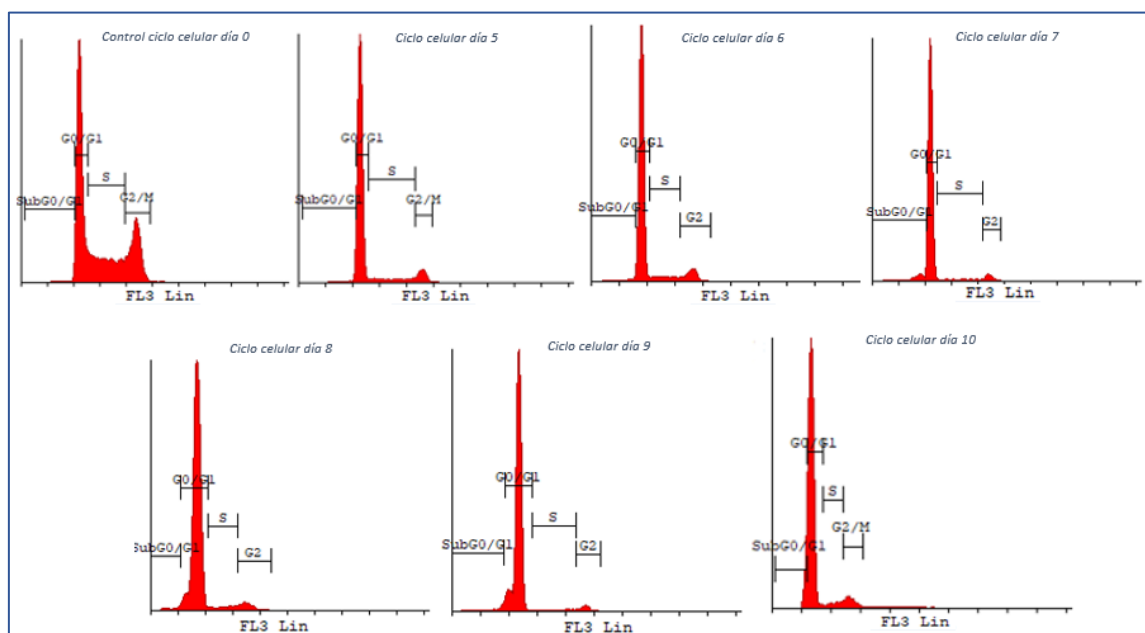


Figura A4: Análisis del proceso de muerte apoptótica a través del ciclo celular (datos completos). (Descrito en el apartado 1.4. de los resultados)

Anexo 2. Localización subcelular de arginasa en neutrófilos

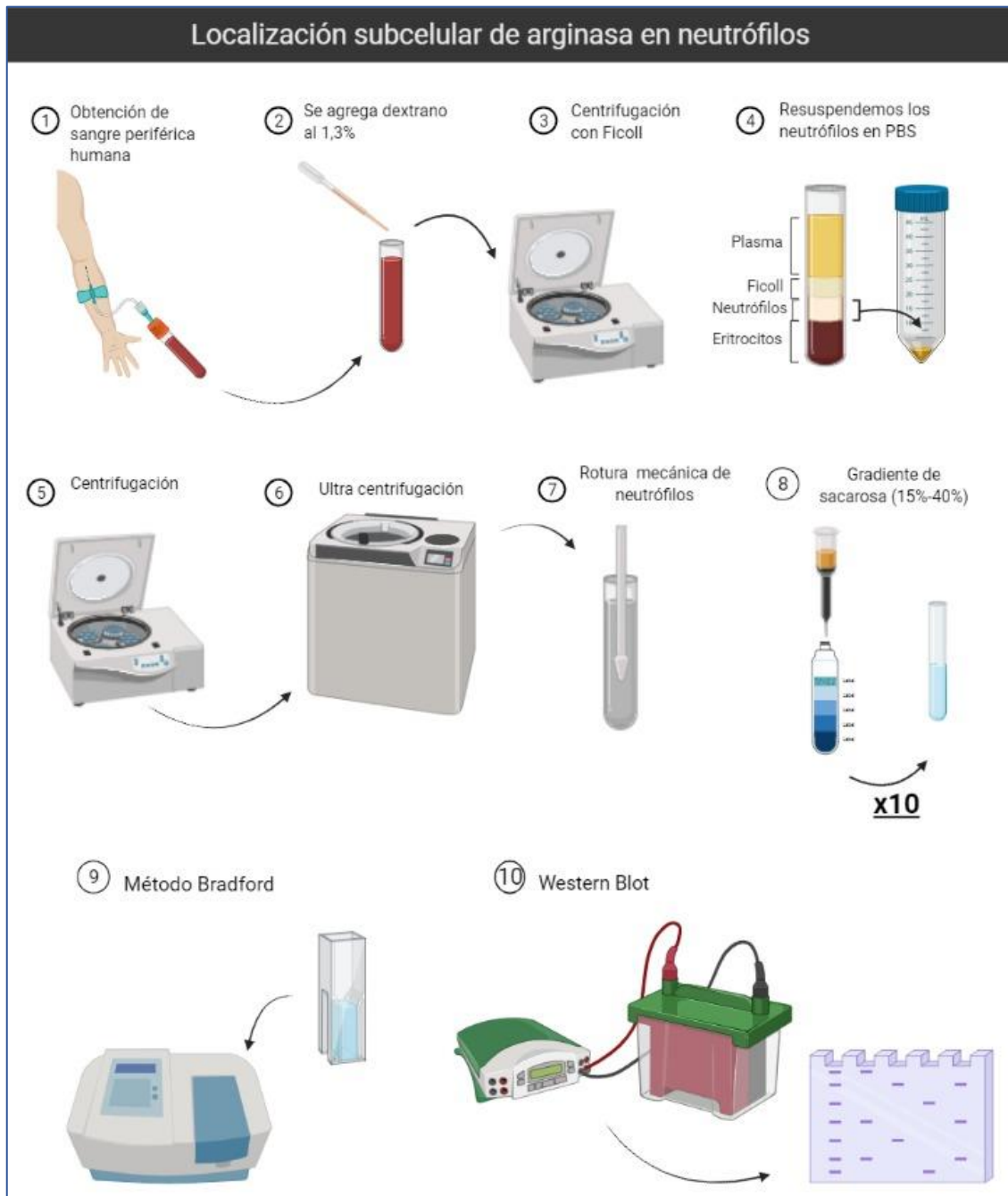


Figura A5: Diagrama de flujo des de la obtención de sangre periférica humana y el fraccionamiento subcelular de neutrófilos, hasta la localización de la arginasa mediante Western blot.